Mejoramiento del Proceso de Fermentación del Cacao

(Theobroma cacao L.)

Variedad Nacional y Variedad CCN51

William Fabián Teneda Llerena

Universidad Internacional de Andalucía

William Fabián Teneda LLerena, trabaja como docente-investigador universitario desde hace 20 años, sustenta las cátedras de Estadística, Diseño Experimental, Auditoría de Calidad, Emprendimiento, Tecnología del Cacao y Operaciones Unitarias.

Se graduó como Ingeniero en Alimentos (1995) y como Magíster en Gestión Estratégica Empresarial (2008) en la Universidad Técnica de Ambato-Ecuador. Es Magíster en Estadística Aplicada a la Investigación en el Instituto Virtual de Ciencias Humanas-Madrid- España (2016) y Doctorando por el Centro Panamericano de Estudios Superiores CEPES-Alianza Alta Tecnología México (2014).

Tiene amplia experiencia profesional en el diseño y desarrollo de nuevos productos alimenticios por 21 años en las cadenas agroalimentarias del cacao, frutas y café. Es consultor y experto internacional Cacao PRACAM –Programa de Apoyo a la Calidad y a la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias en Centroamérica–, en la "Mejora de la Calidad y transformación básica del grano de Cacao" (2015), y AFNOR –Association Française de Normalisation Groupe–. INEN-Instituto Ecuatoriano de Normalización. Norma ISO/WD 19381 Sustainable and traceable cocoa beans. París, Francia. (2016).

Es autor de las obras: *Cacao en Ecuador: Ingeniería, Tecnología y Comercialización* y *Plan de Marketing Contemporáneo, secuenciación, planeación y evaluación.*

Mejoramiento del Proceso de Fermentación del Cacao

(Theobroma cacao L.)
Variedad Nacional y Variedad CCN51

William Fabián Teneda Llerena

EDITA:
UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE ANDALUCÍA.
SERVICIO DE PUBLICACIONES
Monasterio de Santa María de las Cuevas.
Calle Américo Vespucio, 2.
Isla de la Cartuja. 41092 Sevilla
www.unia.es

COPYRIGHT DE LA PRESENTE EDICIÓN:
Universidad Internacional de Andalucía

COPYRIGHT: William Fabián Teneda Llerena

FECHA: 2016

ISBN: 978-84-7993-319-7

EDICIÓN ELECTRÓNICA (PDF)

Contenido

Introducción **13**

1. El cacao en Ecuador 27

1.1. Características 29

1.1.1. Calidad 33

1.1.2. Influencia genética 33

1.1.1. Calidad 33

1.1.2. Influencia genética 33

1.1.3. Influencia Ambiental 34

1.1.4. Cosecha del Cacao 34

1.1.5. Madurez del fruto 34

1.1.6. Sanidad de las mazorcas 35

1.1.7. Tiempo entre cosecha y apertura de mazorcas 36

1.1.8. Apertura de las mazorcas 36

1.2. Transporte del cacao en baba al fermentador 37

1.3. Sistemas de fermentación 38

2. Fermentación del cacao **43**
2.1. Etapas 46
2.1.1. Glucólisis, conversión de glucosa a ácido pirúvico 46
2.1.2. Fermentación Alcohólica 47
2.1.3. Fermentación Acética 48
2.2. Duración de la Fermentación 51
2.3. Características de las almendras fermentadas 51
2.4. Calidad de los granos fermentados 52
2.5. Algo de historia… 52
2.6. Factores que influyen en la fermentación 53
2.6.1. Microorganismos 53
2.6.1.1. Primera Fase 53
2.6.1.1.1. Levaduras 54
2.6.1.2. Segunda Fase 55
2.6.1.2.1. Acetobacter 56
2.6.2. Temperatura 57
2.6.3. Remoción o Volteo 58
2.7. Tipos de fermentación 58
2.7.1 Fermentación en sacos 58
2.7.2. Fermentación en Montón 59
2.7.3. Fermentación en Cajón 61
2.7.4. Fermentación en Tambor Rotatorio 62

3. Investigación **65**

Actividades desarrolladas 67

Población de estudio 67

El muestreo 67

Procedimientos estadísticos. 68

Los instrumentos de recolección de datos 68

Descripción de cómo se validaron los instrumentos. 69

Preparación de las muestras 72

Determinación de índice de fermentación (ioccc no 40) 72

Observaciones 76

Determinación de flavonoides 78

Determinación de polifenoles totales 80

Lugar de ejecución 83

El tiempo 84

Resultados 85

Interpretación de los valores obtenidos de análisis fisicoquímicos 85

Interpretación de los valores obtenidos de análisis enzimáticos 93

Conclusiones y recomendaciones **96**

Bibliografía **99**

4. Anexos **103**

ANEXO A: Datos obtenidos respuestas experimentales. 104

ANEXO B: Análisis Estadístico 121

ANEXO C: Gráficos 128

ANEXO D: Análisis Enzimáticos 132

ANEXO E: Fermentador rotatorio-mejoramiento tecnológico 138

Introducción

La finalidad del presente estudio fue mejorar el proceso de fermentación del cacao (Theobroma cacao l) de las variedades nacional y CCN51 utilizando dos tipos de fermentadores: horizontal y rotatorio [mejoramiento tecnológico], mediante la cuantificación del índice de fermentación, contenido de polifenoles, flavonoides y taninos en almendras de cacao y la cuantificación del contenido de invertasa y proteasas en las almendras y el exudado del cacao.

Los factores en estudio influyeron positivamente sobre la calidad del cacao, los cambios físicos y químicos se inician desde el comienzo de la fermentación con tendencias definidas para cada una de las variables analizadas, se comparó los valores de pH, acidez, % humedad y grasa.

Se observó que el valor de pH en exudado en la variedad Nacional tuvo un mayor aumento en fermentador rotatorio con 3,85, en la variedad CCN51 4,22 en el fermentador horizontal, mientras que para el pH en almendras el valor optimo en variedad nacional fue 4,65 en el fermentador rotatorio y en la variedad CCN51 fue 4,38 en el fermentador rotatorio.

Los valores de acidez para exudado y almendra se reportaron en % Ac. Acético siendo el fermentador rotatorio el que reporto mayor % Ac. Acético con 0,142% en nacional y 0,209% en CCN51.

El cacao fresco de variedad Nacional presentó un contenido de grasa 47,81%, contenido que durante la fermentación decsendió 0,13% en el fermentador rotatorio, la variedad CCN51 en cacao fresco presento un contenido de grasa de 49,72%, contenido que durante la fermentación descendió 1,42% en el fermentador rotativo.

La mejor característica de calidad se presentó en cacao Nacional a las 60 horas de fermentación tanto para el fermentador horizontal y rotatorio, se observó que en el horizontal hubo un mayor valor de flavonoides con 23,70% de quersetina y polifenoles con 53,63 mg ácido gálico/g cacao desengrasado, pero en el rotatorio hubo un índice de fermentación correcto de 1,04.

Mientras que para la variedad CCN51 fue a las 49,5 horas en el fermentador rotatorio con el valor de flavonoides de 21,56% de quersetina y de polifenoles con 45,04 mg ácido gálico/g cacao desengrasado y un mejor índice de fermentación de 1,01 en comparación con el horizontal.

La actividad enzimática en Endoproteasa aspártica se mantuvo estable obteniendo un mejor resultado en el fermentador rotativo y la actividad enzimática de invertasa fue significativamente inactivada durante la fermentación en los dos tipos de fermentadores.

Se concluye que para cacao Nacional es apropiado el fermentador horizontal y para la variedad CCN51 es apropiado el fermentador rotatorio.

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El cacao (Theobroma cacao L.) es uno de los productos agroalimentarios de origen neotropical de mayor penetración en el mercado internacional y sus exportaciones en grano han representado más de 71% del volumen producido, situación derivada del alto valor agregado promocionado por la industria del chocolate y sus derivados (CARTAY, 1999).

La producción cacaotera del Ecuador se está convirtiendo en uno de los blancos más importantes para los negocios, tal es así que las exportaciones del cacao y sus derivados han registrado un crecimiento constante durante el período 2006-2010, alcanzando una Tasa de Crecimiento Promedio Anual (TCPA) de 25.45%. En el 2010, las exportaciones ecuatorianas de este producto fueron de USD 423,211,000 y para julio de 2011 ya se registraron USD 278,062,000 (PRO ECUADOR 2011).

En el año 2009, se registró una producción de cacao a nivel nacional de 120,582 TM, con una superficie plantada de 468,840 Has y una superficie cultivada de 398,104 Has. El cacao está en manos de 94,855 UPAS (familias); de ellas, 55,499 (59%) son pequeños productores que cultivan menos de 10 Has; 28,960 UPAS (31%) están entre el 11 y 50 Has y, 10,936 UPAS (11%) son productores de más de 50 Has (MAGAP, 2010).

Entre las organizaciones más conocidas, hay cuatro con una sólida base de desarrollo y capacidad empresarial, Funedesin, Aprocane, Fedecade, Kallari. (CORPEI, 2005).

Funedesin, organizacion dentro del proyecto BID/Amaznor, de la zona Cascales, Sacha y otras, la que cuenta con un fuerte apoyo del proyecto BID/Amaznor y la asesoría de la GTZ, se halla en un decisivo proceso de desarrollo con seis centros de acopio los que están en proceso de certificación orgánica, permitiendo su ampliación a otros mercados (CORPEI, 2005).

Aprocane es una organización de pequeños productores del norte de Esmeraldas, que recibe apoyo de un proyecto del BID y asesoría técnica de la GTZ para mejorar la producción y calidad del cacao, así como promover una gran comercialización dentro de la zona (CORPEI, 2005).

Actualmente Fedecade es la única organización de pequeños productores que tiene tres tipos de certificación (Orgánica, Comercio Justo y Rainforest Alliance). Los Proyectos apoyados por el FECD y la GTZ, así como los esfuerzos de CCD han apuntalado en el proceso de desarrollo alcanzando más clientes que volumen de producción.

Kallari, es otra de las organizaciones que recibe un importante apoyo a través del proyecto BID/Amaznor para mejorar su infraestructura, como la de los centros de acopio. También mantiene un acuerdo con GTZ para la asistencia técnica en su proceso de acceso a mercados, enfocándose en cacao de alta calidad y con denominación de origen. (CORPEI, 2005).

Dependiendo de sus características y estado de desarrollo las organizaciones de pequeños productores necesitan diferentes tipos de apoyo, entre los problemas

que enfrenta este sector, se encuentran la existencia de una fuerte competencia, las altas tasas de interés del sistema bancario, la tendencia del precio del cacao a la baja debido a la sobreproducción mundial, la falta de apoyo por parte del gobierno y debido a que los procesos tecnológicos aplicados no se han controlado eficientemente (ROSERO, 2002).

En referencia a los procesos artesanales la mayor problemática es la calidad e higiene. Las organizaciones de pequeños productores no tienen el financiamiento para establecer una planta propia con la maquinaria necesaria. (CORPEI, 2005).

Organizaciones Agroindustriales enfrentan problemas de calidad en los productos que comercializan: cacao de las variedades nacional y CCN51, debido a la heterogeneidad en el grado de fermentación puesto que no cuenta con estándares para el proceso, por esta razón cada agricultor realiza las operaciones de manejo y acondicionamiento de forma tradicional.

Los mercados de calidad tienen un interés creciente en encontrar cacao de alta calidad, de sabores y orígenes especiales. Varias empresas chocolateras internacionales se han fijado en el cacao ecuatoriano por sus marcadas características, como la transnacional Nestlé que, por gestión de su filial en el país, está exportando 8000 toneladas anuales, la fábrica de helados Wall´s, la más importante de Inglaterra, utiliza “la calidad y la finura del chocolate nacional” como enganche de venta en los canales de televisión y periódicos ingleses, el “Magnum Ecuador Dark” posee 62% de cacao ecuatoriano, lo cual hace honor a su eslogan: “Un chocolate digno de culto”.

El cacao ecuatoriano es mundialmente apreciado por su sabor y aroma, su calidad y finura; estas características no son únicamente producto de la variedad cultivada y de las condiciones climáticas del país sino de la fermentación de la semilla. Esta etapa es muy importante en el procesamiento del grano, ya que se producen los cambios bioquímicos que causan una disminución del amargor y la astringencia y se generan los precursores del aroma y sabor a chocolate (Ortiz y colaboradores, 2009).

Ortiz y colaboradores, (2009) señalan en su artículo “Influencia de varios factores sobre las características del grano de cacao fermentado y secado al sol” que

varios factores influyen sobre la fermentación del cacao, entre ellos el tipo de cacao (Braudeau, 1970; Lemus et al., 2002), tiempo de almacenamiento del fruto o mazorca antes de la apertura y el desgrane (Barel, 1987; Dias y Avila, 1993; Schwan et al., 1990; Torres et al., 2004), tipo de fermentador usado (Contreras et al., 2004; Graziani de Fariñas et al., 2003a; Nogales et al., 2006), tiempo del proceso y frecuencia de remoción de la masa fermentante (Puziah et al., 1998; Senanayake et al., 1997; Schwan et al., 1990). Contreras y colaboradores (2004) concuerdan que, el tipo de fermentador (Vargas et al., 1989), el volumen de la masa (Braudeau, 1970; Puziah et al., 1989; Portillo, 2000) y el volteo durante el proceso (Puziah et al., 1989) afectan la fermentación y en consecuencia la calidad del grano fermentado.

El proceso fermentativo se realiza de distintas maneras, y los métodos tradicionalmente más utilizados son la fermentación en canastas, cajas o en montones (Braudeau, 1970). Con estos sistemas el porcentaje de almendras no fermentadas es elevado, aproximadamente llega al 25%, y 15%, respectivamente, y la calidad de la fermentación es insuficiente, factor que les resta competitividad en el mercado. Estudios realizados por Haiyee (2002) y Espinosa et al (1998) muestran algunas ventajas de la utilización de un fermentador rotatorio, entre las que se pueden mencionar la reducción de mano de obra y tiempo de procesamiento, fácil manejo y remoción de la masa, así como la obtención de mayor rendimiento y de mejor calidad.

Por otro lado, en la explotación cacaotera solo se aprovecha económicamente la semilla, que representa aproximadamente un 10% del peso del fruto fresco. Las semillas de cacao son la fuente del cacao comercial: chocolate y manteca de cacao (Barazarte, 2008).

En las cosechas de cacao, el exudado es desechado durante el proceso de cura, generándose contaminación y desaprovechamiento de las propiedades organolépticas de este subproducto (Kalvatchev, 1998).

Según Quimbita, el exudado puede ser valorizado a través de la elaboración de posibles nuevos productos, siendo viable el uso de dos técnicas que impiden el pardeamiento enzimático: (a) estabilización térmica, empleando las condiciones

de operación para zumos de frutas 77°C – 60s, 85°C – 60 s, 88°C - 15 s, y estabilización química del exudado mediante meta bisulfito de sodio y ácido ascórbico. La efectividad de la estabilización se verificó mediante la prueba de guayacol.

Frente a ese panorama surge este estudio como una propuesta metodológica para mejorar el proceso productivo de fermentación en las Asociaciones Agroindustriales productoras de Cacao, utilizando dos tipos de fermentadores un rotatorio construido por los propios productores y el tradicional realizado en cajas, y adicionalmente explorar la posible aplicación del residuo (exudado) eliminado durante la fermentación como materia prima para la extracción enzimas (proteasas e invertasa) de amplia aplicación en la industria.

OBJETIVOS

General:

Mejorar el proceso de fermentación del cacao (Theobroma cacao l) de las variedades nacional y CCN51 utilizando dos tipos de fermentadores, para obtener mayores niveles de calidad.

Específicos:

- Determinar el mejor tratamiento de fermentación de cacao variedad nacional y CCN51 empleando fermentadores horizontal y rotatorio [mejoramiento tecnológico] mediante la cuantificación del índice de fermentación, contenido de polifenoles, flavonoides, y taninos.

- Cuantificar el contenido de invertasa y proteasas en las almendras y el exudado del cacao, residuo eliminado en el proceso de fermentación con el propósito de establecer su posible aplicación como fuente para la obtención de estas enzimas.

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El artículo 283 de la Constitución Nacional del 2008 establece que el sistema económico ecuatoriano es social y solidario. Para cumplir con el mandato constitucional, la política del actual gobierno descrita en el numeral 11.2 del Plan Nacional para el Buen Vivir, impulsa la actividad de pequeñas y medianas unidades económicas asociativas.

Desde octubre del 2010 se firmó un acta de compromiso con las Asociaciones Productoras de Cacao y han culminado ya tres fases del Plan de Transferencia Tecnológica para el Desarrollo Agroindustrial del Cacao, desarrollando exitosamente la aplicación de sub productos no tradicionales del cacao para su utilización en vino de almendras, bebidas energizantes, productos deshidratados recubiertos de chocolate y aplicaciones en productos funcionales, sin embargo con el trabajo realizado no se ha podido dar soluciones a los problemas planteados por los comuneros, respecto del mejoramiento del proceso de fermentación, debido a limitaciones de tiempo, recursos económicos, tecnológicos y humanos que se dan en los procesos de vinculación

La Corporación de Productores Agropecuarios de Cacao, es una entidad que realiza su actividad en el ámbito de siembra, poscocecha, fermentación, secado y procesamiento de cacao. Las familias que viven en el sector se dedican principalmente a la agricultura pero también, en menor escala a la ganadería, porcicultura, avicultura y están incursionando de forma incipiente en la piscicultura. Entre los principales productos que cultivan está el plátano (100 ha), maíz (200 ha), caña de azúcar (250 ha), arroz (500 ha) y el cacao que lo siembran a gran escala (1000 ha).

En los últimos diez años, alrededor del 60% de las familias de la Asociación han trabajado para mejorar la producción del cacao. En la zona, el 95% de los cultivos de cacao son de la variedad CCN 51 y un 5% de la variedad nacional conocida también como sabor arriba.

En el sector en estudio, el manejo pos-cosecha no es el adecuado y genera una gran variabilidad que ha impedido garantizar a los compradores un producto con una calidad definida y estable. Este hecho ha incidido negativamente en el

precio y en el prestigio del cacao. En cuanto a la fermentación, la aplicación de un determinado método depende, básicamente, de la experiencia del productor. Se hace necesario entonces, mejorar el proceso fermentativo del cacao con el fin de incrementar la producción y la calidad, lo que permitiría aumentar los réditos económicos de la asociación

La fermentación del cacao es una etapa muy importante en el procesamiento del grano, ya que se producen los cambios bioquímicos que dan origen a los precursores del aroma y del sabor. Diversos factores influyen sobre el proceso fermentativo entre ellos destaca el tipo de cacao, las condiciones ambientales, el almacenamiento de la mazorca, así como el sistema empleado en la fermentación, el tipo de fermentador, el volumen de la masa y el volteo durante el proceso.

La fermentación potencia el sabor del cacao. BECKETT (1994) señala que amontonar las almendras blancas y viscosas que recubre las habas dentro de recipientes, hace que se inicie la fermentación y suba rápidamente la temperatura. El proceso debe controlarse para evitar que mueran las levaduras y se inactiven enzimas cuya importancia es crucial durante este tratamiento.

El trabajo de AMIN y col. (1998) demostró que la frecuencia de remoción también influye sobre las características químicas de los granos. Varios autores han observado además que el volumen de masa y la frecuencia de remoción inciden significativamente sobre los precursores del sabor, de forma que una elevada cantidad de masa y alta frecuencia de remoción incrementan su concentración (PUZIAH et al., 1998). Además, se ha detectado una disminución de la acidez (SCHWAN et al., 1990; SENANAYAKE et al., 1997) y un aumento de la actividad proteolítica (PUZIAH et al., 1998) al remover la masa durante la fermentación. Por ello es necesario realizar una investigación sobre el tipo de fermentador que permita obtener calidad superior.

Se ha considerado indispensable evaluar los cambios de algunos factores que usualmente varían durante la fermentación de la semilla del grano de cacao, en la primera parte del trabajo, para así generar información que permita a los socios de la Corporación de Productores Cacaoteros – ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL, establecer la necesidad de controlar los factores que definen la calidad del

producto mediante la determinación de la cinética del proceso de fermentación del cacao.

Las semillas de cacao están rodeadas de un mucílago o pulpa que contiene de 10 a 15% de azúcar, 1% de pectinas y 1.5% de ácido cítrico. Durante el proceso de fermentación del cacao la pulpa es removida e hidrolizada por microorganismos. Parte de este mucílago es necesario para la producción de alcohol y ácido acético en la fermentación de las almendras, pero de 5 a 7% de la pulpa hidrolizada drena como exudado. El exudado del cacao es un líquido rico en azúcares que se expulsa dentro del proceso de fermentación y, tiene un cocktel de enzimas, levaduras y bacterias. Existen pocos estudios sobre caracterización y utilización del exudado producido en la fermentación de cacao (Quimbita et al., 2007) y en ninguno se determina el contenido de las enzimas presentes. Por estas razones en este estudio se cuantificará el contenido de proteasas e invertasa, enzimas que tienen variadas aplicaciones industriales.

FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

El centro de origen del cacao parece estar situado en el noroeste de América del Sur, en la zona alta amazónica. Sin embargo, se ha encontrado indicios de grandes plantaciones de cacao en los territorios ocupados por la civilización Maya en la península de Yucatán. Actualmente se cultivado en la mayoría de los países tropicales, en una zona comprendida entre los 20° latitud norte y los 20° latitud sur de la línea ecuatorial (QUINGAIZA, 2007).

La zona cacaotera del Ecuador se encuentra dentro de la zona ecuatorial terrestre, en las planicies de la Costa y del Oriente ecuatorianos, que comprende desde las estribaciones de las Cordilleras Oriental y Occidental de los Andes, hasta el Océano Pacífico en toda su extensión (ENRIQUEZ, 2004).

El cacao de Ecuador ha sido considerado como un cacao diferente a los otros, debido a sus características organolépticas especiales que le diferencian de otros cacaos de calidad con otros sabores también apetecidos por mercados especializados (sabor a nuez o sabor frutal) (QUINGAIZA, 2007).

Existen dos clases de cacao: el cacao básico y el cacao fino de aroma (cacao arriba en el caso ecuatoriano). Alrededor del 95% de la producción mundial anual puede considerarse como cacao básico, el cual procede en su mayoría de África, Asia, América Central y del Sur, en especial de la variedad forastero. El volumen restante, corresponde a cacao fino de aroma. (LASTRA, 2004).

La variedad de cacao ecuatoriano CCN-51 (Colección Castro Naranjal), es actualmente de gran interés en el país, porque se ha probado que con la utilización de prácticas adecuadas, puede ser un cultivo resistente a plagas y enfermedades, alcanzando elevados niveles de productividad (QUIMBITA, 2007)

Los principales productores de cacao a nivel mundial son: Costa de Marfil, Ghana, e Indonesia, países que abarcan alrededor del 70% de la producción global. (RAMIREZ, 2006)

Pese a que actualmente Ecuador es un país con una pequeña producción de cacao en el ámbito mundial (4% de la producción), para los cacaos finos de aroma, representa el primer productor con un amplio margen de diferencia, 60% de la producción mundial (ENRIQUEZ, 2007).

El cacao Nacional tiene un tratamiento especial en el mundo del cacao y de los chocolates. El cacao del Ecuador significa alta calidad y sabores especiales.

1. El cacao en Ecuador

1.1. Características

La producción cacaotera del Ecuador se está convirtiendo en uno de los blancos más importantes para los negocios de exportación. Varias empresas chocolateras internacionales se han fijado en la calidad del cacao de nuestro país, como es el caso de la transnacional Nestlé que, por gestión de su filial en el país, está exportando 8 000 toneladas anuales. Nestlé se interesó en el producto nacional debido a sus propiedades nutricionales, que permiten cumplir con los requisitos para la elaboración de chocolate de primera calidad.

El cacao ecuatoriano es reconocido mundialmente por sus marcadas características de aroma y color sumamente apreciadas en la preparación de chocolates finos, revestimientos y coberturas.

Debido al interés mostrado por el mercado internacional, se busca mejorar la producción de cacao tradicional, para satisfacer a cabalidad un futuro incremento en la demanda.

La buena calidad del producto ecuatoriano depende, en gran medida, de la utilización de nuevas técnicas de fertilización, lo cual ha elevado la productividad y ha repercutido en un incremento en la población de microorganismos y microfauna del suelo. Además, se ha favorecido el intercambio catiónico y los procesos nutrimentales y biológicos del cultivo.

El cacao representa el tercer rubro de exportación agrícola del país y constituye una fuente de ingreso para más de 100 000 pequeños productores de Esmeraldas, la Amazonía, Los Ríos, Guayas y Manabí. La gran demanda de nuestro cacao se atribuye a las características únicas que posee, pues con él se fabrica el chocolate oscuro con mayor demanda en el mundo.

La calidad y la finura del chocolate nacional, llevado directamente a Wall´s, la fábrica de helados más importante de Inglaterra, es el enganche que esta firma ha utilizado en los canales de televisión y periódicos ingleses.

Imagen 1.1. Cacao Variedad Arriba

Oscuramente delicioso, el chocolate ecuatoriano contrasta con la inocencia del cremoso interior de vainilla para, así, formar uno de los más finos helados jamás creados. El “Magnum Ecuador Dark” contiene 62% de cacao ecuatoriano, lo cual hace honor a su eslogan: “Un chocolate digno de culto”.

Actualmente, el consumir chocolate oscuro, bajo en azúcar, en leche, se presenta como la principal preferencia de la mayoría de clientes a escala mundial. Una prueba de ello es el aumento en el consumo de cacao fino o de aroma que, en 2008, llegó al 42% en Alemania y al 30% en los EEUU.

Entre las principales cualidades del cacao, se puede mencionar su cualidad antioxidante, quizás más que otros alimentos y bebidas ricos en antioxidantes polifenoles. También es muy beneficioso para el corazón, pues, si se consume a diario y en pequeñas cantidades el chocolate negro, disminuye el riesgo de sufrir un ataque cardíaco. Además, tiene un gran efecto anticancerígeno, estimulador cerebral, antitusígeno y antidiarreico.

La producción de cacao en nuestro país bordea las 100.000 toneladas anuales. Éstas son cultivadas en aproximadamente 300 000 hectáreas y dan trabajo a más de 100 000 familias.

Según estadísticas de la Organización Internacional del Cacao (ICCO), Ecuador exporta el 75% del cacao de aroma.

Las exportaciones de esta fruta representan el 6.7% del PIB (Producto Interno Bruto), y los exportadores y productores representan el 12% de la PEA (Población Económicamente Activa).

El cacao "Nacional " ecuatoriano, es reconocido internacionalmente por su excelente calidad y aroma floral.

El cacao Nacional tiene un tratamiento especial en el mundo de cacao y de los chocolates.

El cacao del Ecuador significa alta calidad y sabores especiales. Los mercados de calidad tienen un interés creciente en encontrar cacao de alta calidad, de sabores y orígenes especiales. Hasta los noventa, los chocolates de alto contenido de cacao (>60%) tenían un mercado pequeño, los consumidores preferían más los chocolates dulces con leche.

El CCN-51 es un cacao clonado de origen ecuatoriano que el pasado 22 de junio fue declarado, mediante acuerdo ministerial, un bien de alta productividad. Con esta declaratoria, el Ministerio de Agricultura brindará apoyo para fomentar la producción de este cacao, así como su comercialización y exportación. “Este cacao es, actualmente, uno de los más productivos del mundo”, comentó Sergio Cedeño Amador, presidente de la Asociación de Productores de Cacao Fino y de Aroma (Aprocafa). (Márquez, 2003).

Las semillas de cacao están rodeadas por una pulpa aromática la cual procede de sus tegumentos. La pulpa mucilaginosa está compuesta por células esponjosas parenquimatosas, que contienen células de savia ricas en azúcares (10-13%), pentosas (2-3%), ácido cítrico (1-2%), y sales (8-10%). Durante el proceso de cosecha de las semillas de cacao (el producto de exportación), la pulpa es removida por fermentación e hidrolizada por microorganismos. La pulpa hidrolizada es conocida en la industria como "exudado".

El exudado de cacao se puede utilizar para producir nata, un producto parecido al agar y consumido como postre en Asia. La pulpa se puede consumir fresca en forma de jugos o "batidos". Además, la pulpa se puede preservar por congelación y ser utilizada para dar sabor a helados y yogures.

A fin de establecer una normativa jurídica que impulse y proteja al cacao fino, al sector cacaotero y al producto con su variedad, la Comisión de Desarrollo Económico prepara un borrador del proyecto de ley que se presentará a la Asamblea Nacional con oportunidad de conmemorar el Día Mundial del Cacao.

Debido a la clonación del producto, Ecuador corre el riesgo de perder su ubicación como exportador de cacao fino, por lo que propone una ley que permita al Estado proteger la "pepa de oro", impulsando su siembra e industrialización, puesto que ello permitirá mejorar la economía del país y tener el mejor chocolate para exportar. Hay que luchar para que Ecuador mantenga su posición.

Según Quiroz (2007) El Ecuador tiene un histórico prestigio por ser uno de los principales productores de caco fino y de aroma en el mundo, con aproximadamente 70.000 Tm anuales, lo que significa el 60 % de la producción mundial de este tipo.

La calidad del cacao para el mercado mundial, depende del manejo del material genético, tipos de semillas a ser empleadas por parte de los agricultores cacaoteros y del tostado del cacao en las fábricas. Cada grupo de individuos tiene sus responsabilidades dentro del concepto de calidad del chocolate de una u otra forma.

Imagen 1.2. Cacao Variedad CCN51

1.1.1. Calidad

Una definición simple de calidad es “La propiedad o conjunto de propiedades, inherentes a una cosa, que permita apreciarla como igual, mejor o peor que las restantes de su especie”. (Diccionario de la lengua Española, 1984).

1.1.2. Influencia genética

Aunque existe poco conocimiento de información genética sobre la calidad del cacao, se estima que las características de sabor resultan de la interacción de numerosos genes. Las diferencias se hacen más notorias entre los tres tipos de

cacaos comerciales reconocidos Criollo (Venezuela), Forastero y Trinitario y los híbridos naturales formados entre éstos (Enríquez 1985).

El cacao nacional de Ecuador desde la época de la colonia es conocido internacionalmente como “Arriba” por su sabor y aroma especial. Para los años 1910 este producto era uniforme y sin defectos, no tenía rival en el mercado y todas las almendras tenían el sabor arriba, además una fermentación de 24 horas era suficiente.

Actualmente, sin embargo, se está produciendo un paulatino deterioro en la calidad de la población del cacao tipo nacional debido a la expansión del clon CCN–51 en las fincas de los productores pequeños y medianos quienes, por su alto índice de productividad, lo han utilizado como material de resiembra para cubrir espacios dentro de la huerta, o para sembrar pequeños lotes que forman parte de la unidad productiva.

1.1.3. Influencia Ambiental

La deficiencia de agua y nutrientes en el suelo, trae como consecuencia una reducción en el tamaño de las mazorcas y de las almendras. Además origina variaciones significativas en la composición bioquímica de los cotiledones; el metabolismo del Nitrógeno en la planta de cacao es sensible al medio ambiente.

1.1.4. Cosecha del Cacao

Para la cosecha, la calidad de la mazorca está determinada por varios factores, como la adecuada madurez, el estar libre de insectos, enfermedades, daños mecánicos, etc.

1.1.5. Madurez del fruto

Las mazorcas deben tener un estado de madurez tal que permita una óptima fermentación, (Enríquez, 1985; López 1987).

Si la mazorca es inmadura, ésta aún no ha desarrollado completamente los jugos del hilio o lo que se conoce como baba del cacao (Mucílago). En este caso las almendras que caen junto con otras bien desarrolladas, presentan una resistencia natural a la fermentación, afectando el sabor del chocolate, y la calidad de la manteca del cacao.

Si la mazorca está sobremadura, las almendras no tienen la suficiente cantidad de jugos para iniciar la fermentación. Esto no representaría problemas si solo se tratara de unas pocas mazorcas en una masa grande, pues las otras mazorcas podrían suplir el material necesario; pero cuando la cantidad de mazorcas sobremaduras es alto se puede convertir en un factor crítico por falta de sustrato para los microorganismos en su estado de desarrollo inicial.

En general cuando hay sobremaduración de una mazorca, algunas semillas están germinando o se encuentran todas germinadas. Bajo estas condiciones esas semillas no sirven para la fermentación, ni para dar sabor a chocolate.

En general la sobremadurez de la mazorca viene acompañada por otros defectos como enfermedades y daños de roedores. Desde el punto de vista del productor, conseguir un estado ideal de madurez en las mazorcas trae algunas complicaciones, especialmente para el agricultor pequeño.

La manera de resolver este problema es formando cooperativas o asociaciones para realizar el proceso de fermentación, y lograr tener volúmenes adecuados para realizar el proceso en épocas críticas del año, las mismas que pueden variar ligeramente en las diferentes regiones del país.

1.1.6. Sanidad de las mazorcas

Las mazorcas que tengan alguna enfermedad deben ser retiradas de la pila que se tiene para la fermentación. En este caso el sustrato típico de la fermentación está alterado y por consiguiente los microorganismos o levaduras iniciales, no pueden crecer para iniciar la fermentación. El material enfermo interfiere durante todo el proceso de fermentación.

En el Ecuador donde la Monilia (Monilia roreri) y Escoba de Bruja (Crinipellis perniciosa) afectan un alto número de mazorcas, el agricultor debe separar las mazorcas enfermas y lo que obtenga de este producto, comercializarlo en forma separada. Algunos comerciantes las compran para extraer la grasa de las semillas o para otros menesteres, en donde no tiene ninguna importancia el sabor a chocolate.

1.1.7. Tiempo entre cosecha y apertura de mazorcas

Algunos técnicos recomiendan guardar en pilas las mazorcas maduras, para iniciar la fermentación en dos o tres días, de esta manera las mazorcas han perdido algo de agua y tienen menos jugos, lo que favorece la iniciación de la fermentación y la elevación de la temperatura. (Wood y Lass, 1985).

De esta manera las almendras pierden hasta un 40 % de los azúcares del hilio, un 50% del volumen y un 4% de la humedad de la pulpa. Con esta práctica se ha conseguido una buena fermentación y mejorar la acidez de las almendras (Said y Musa, 1988). En el país se ha realizado este proceso en el clon CCN-51 con resultados buenos sobre la disminución de la acidez y el incremento de la suavidad de las almendras.

1.1.8. Apertura de las mazorcas

La calidad dependerá en gran medida de la forma en que se abran las mazorcas, operación que debe hacerse sin dañar las semillas con cortes o aplastamientos cuidando además que al, momento de separar las cáscaras de las almendras, éstas queden limpias sin la placenta o trozos de cáscara, pues la presencia de estos residuos afectan la fermentación y la calidad.

Los métodos de apertura manual de las mazorcas pueden ser: con cuchillos, garrotes o contra una piedra o madero fijo, por otra parte el lugar de la apertura también juega un papel importante ya que si se hace sobre el suelo, aunque se ponga hojas de algunas musáceas el material se contamina con tierra, basura, perjudicando enormemente la fermentación.

Imagen 1.3. Cosecha de cacao en finca. Cumandá-Chimborazo-Ecuador

1.2. Transporte del cacao en baba al fermentador

El transporte del cacao se debe efectuar con el mayor cuidado posible, para evitar la contaminación con tierra, pasto, desperdicios, etc. Lo mejor será tener un lugar apropiado, de madera o cemento bien pulido, en el cual no exista peligro de contaminación, no deben haber animales alrededor, para evitar otros tipos de contaminación (inclusive heces fecales).

Los recipientes que reciben las almendras deben estar limpios. Lo mejor es usar los mismos todo el tiempo, pero manteniéndolos en lugares adecuados donde no lleguen los animales, cucarachas o ratones.

Imagen 1.4. Recolección de las almendras de cacao

El transporte de las almendras debe hacerse en una forma que no sufran contaminación en el camino. Las bestias o mulas con “Arguenas”, “Chalos” o aparatos especialmente diseñados para el propósito son adecuados medios de transporte para el cacao en Baba.

1.3. Sistemas de fermentación

La fermentación es quizás el paso más importante del cual depende los resultados finales. Hay un sinnúmero de formas y recipientes para fermentar una masa de cacao. El productor debe fermentar su cacao adoptando la técnica más útil y económica para sus propósitos, utilizando los métodos de Montón o de Cajones.

Imagen 1.5. Fermentación de cacao en montón

El tiempo de duración de la fermentación, es la clave para obtener un buen resultado, pues el tiempo variará de acuerdo al tipo de material genético que posea. Así el cacao “Nacional de Ecuador o “cacao Arriba”,

Fermenta bien uno o dos días con pasar amontonado, el resto de días solo debe ser amontonado por la noche mientras dura el proceso de secado.

Un factor muy importante a considerar es que jamás se debe mezclar almendras extraídas de mazorcas en diferentes días. Es necesario fermentarlas por separado quizá se puedan secar juntas, pero jamás fermentar mezcladas (López, 1987).

Imagen 1.6. Fermentación de cacao en cajones horizontales

2. Fermentación del cacao

La fermentación consiste en una serie de cambios físico-químicos que generan el desarrollo de sabor y aroma a chocolate, con:

- Cambios en la pigmentación interna, color violeta a marrón claro.
- Transformación del sabor astringente de los cotiledones.
- Transformación de los azúcares en alcoholes por las levaduras, los cuales son a su vez convertidos en ácido acético por las bacterias acéticas.

Durante este proceso, existe una relación ordenada entre microorganismos y las variaciones de temperatura, pH y humedad, con la formación de alcoholes, ácidos y compuestos polifenólicos, que matan el embrión, disminuyen el sabor amargo y se producen las reacciones bioquímicas que forman el chocolate.

Dichas alteraciones químicas en el interior del haba de cacao, dependen de la muerte de las células del cotiledón, con la cual sus membranas celulares se degradan y aumentan su permeabilidad, permitiendo el contacto entre los diversos componentes celulares.

Así los polifenoles, que producen el sabor astringente, pueden difundirse entonces hacia las células adyacentes, donde se encuentran con diversas enzimas que provocan reacciones hidrolíticas gracias a las condiciones anaerobias del haba. Si no se degradan, pasan al grano seco, provocando el color violeta de la almendra, que indica errores en el proceso de fermentación.

2.1. Etapas

El proceso de fermentación se inicia con la transformación del azúcar de la pulpa de los granos en alcohol y dióxido de carbono; el pH y la temperatura se elevan. Estos cambios ocurren durante las primeras 24 o 36 horas.

Imagen 2.1. Inicio del proceso de fermentación del cacao

La transformación ocurre con las siguientes reacciones:

2.1.1. Glucólisis, conversión de glucosa a ácido pirúvico

La glucólisis ocurre en el citosol y consiste en la degradación de glucosa, glucosa – 6- fosfato o fructosa para formar ácido pirúvico.

La glucólisis consiste de dos fases:

- En la primera fase se transforma la glucosa (C6) en dos moléculas de tres carbonos (C3)
- En la segunda se oxidan las moléculas C3 transformándose en dos moléculas de ácido pirúvico, ATP y NADH + H+.

La reacción global es:

Glucosa + 2 NAD+ + 2ADP + 2H2PO4 2 Ác. pirúvico + NADH + 2H+ + 2 ATP+ 2H2O

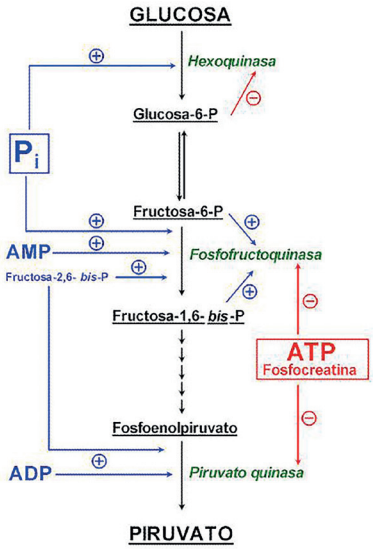


Figura 2.1. Glucólisis

2.1.2. Fermentación Alcohólica

Bajo condiciones anaeróbicas, sin participación del oxígeno molecular, el ácido pirúvico se transforma en alcohol etílico.

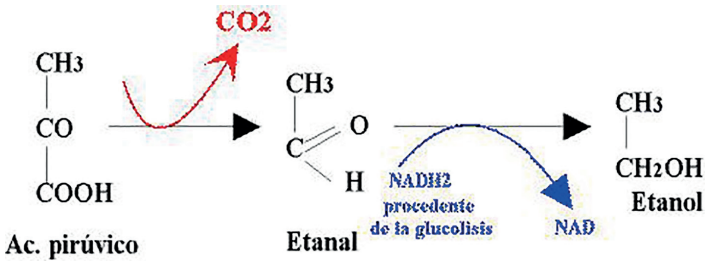


Figura 2.2. Fermentación Alcohólica

Recuerde: La presencia del oxígeno causaría productos intermedios de la oxidación polifenólica capaces de destruir las enzimas hidrolíticas.

2.1.3. Fermentación Acética

En la tercera fase gracias a la remoción que oxigena el ambiente y el descenso del pH, se puede convertir el etanol obtenido en ácido acético (CH3COOH), a través de la oxidación del alcohol, es decir sucederá una fermentación oxidativa. La temperatura ideal del proceso de fermentación acética está entre 28 y 30ºC y el pH óptimo es de 4,5.

La oxidación del etanol se realiza en dos etapas: en la primera el etanol se oxida a acetaldehído y en la segunda el acetaldehído a ácido acético.

Se forman otros productos como acetato de etilo, butanol, isopropanol, compuestos intermedios de acetaldehído y ácidos orgánicos.

La reacción es:

$$C_2H_5OH + O_2 \; CH_3COOH + H_2O$$

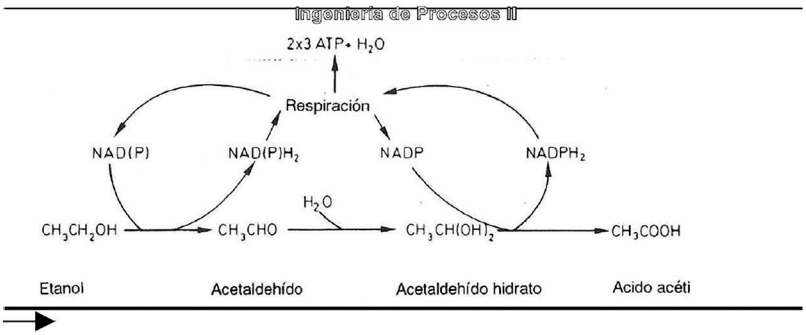


Figura 2.3. Fermentación Acética

Imagen 2.2. Proceso de fermentación a las 48 horas

Cuadro Resumen

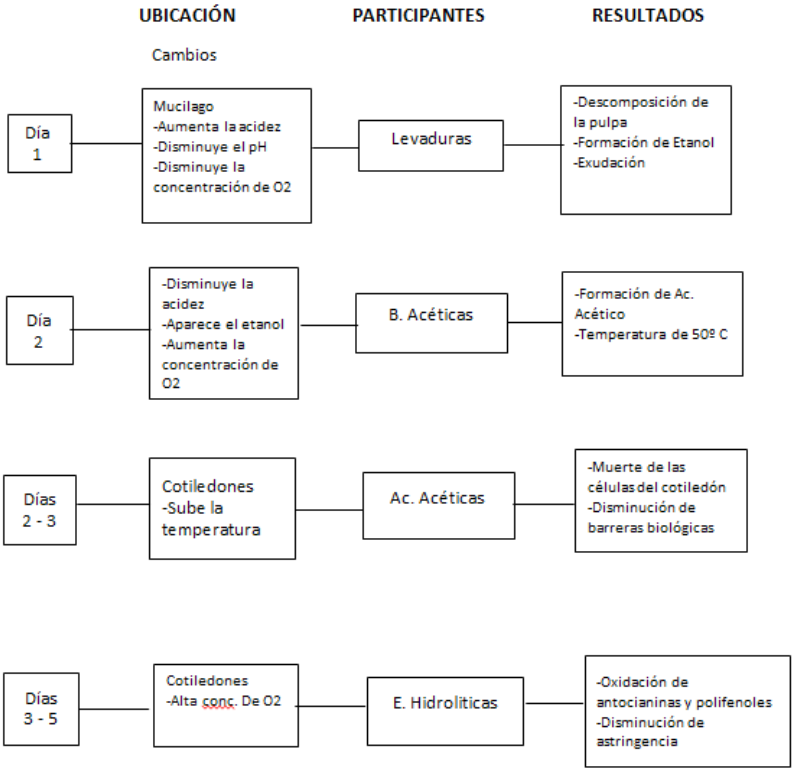


Figura 2.4. Cambios Bioquímicos en la fermentación

2.2. Duración de la Fermentación

La fermentación dura 5 días o 120 horas, durante los cuales habrá muchos cambios a nivel físico-químico dentro y fuera de los granos de cacao, como la aparición y desaparición de sustancias polifenólicas como:

- Cianidinas, que entre el tercero y quinto día de fermentación desparecen por completo al integrar parte de las reacciones bioquímicas ocurridas
- Leucocianidinas, aparecen entre el segundo y tercer día, pero luego desaparecen al combinarse con proteínas.

Existen especies de cacao, que crecen en países vecinos como Venezuela, que necesitan menos días para su fermentación como es el caso de Cacao Criollo de cotiledón blanco, que requiere solo tres días; en cambio el Cacao forastero de cotiledón morado o púrpura necesita ocho días.

2.3. Características de las almendras fermentadas

Externas

- Tamaño, debe ser constante en el lote fermentado.
- Forma, puede ser de forma redonda y plana
- Color, según la variedad de cacao fermentado, pero en general va de rojo-pardo a pardo pálido
- Olor, si la fermentación fue correcta será agradable; de lo contario será acético y muy desagradable
- Cutícula, debe estar entera para evitar la invasión de insectos o microorganismos.

Internas

- Color, va de castaño a castaño pálido, según la variedad fermentada.
- Textura, los cotiledones se separan con facilidad de la cutícula o testa.

Sabor, basado en las siguientes características:

- Amargor, debido a la teobromina
- Astringencia
- Sabor aromático
- Sabor frutal
- Sabor a nuez

2.4. Calidad de los granos fermentados

Entonces para definir la calidad de los granos fermentados, se los clasifica en 4 grupos, que son:

1. Buenos: Granos pardos y quebradizos
2. Medianos: Granos pardos, con textura parecida al queso o muy dura al cortar.
3. Malos: Granos con cotiledones púrpuras, con textura parecida al queso o muy dura al cortar
4. Mohosos: Granos con crecimiento fúngico en los cotiledones y/o en la cutícula.

2.5. Algo de historia…

En las décadas de 1940 y 1950 las compañías chocolateras transnacionales buscaban en Sudamérica y el Caribe las variedades de cacao (Theobroma cacao L.) con las mejores características para sus procesos, por lo que necesitaban fermentar cantidades muy pequeñas de granos en corto tiempo.

Ahora sabemos que este tipo de procedimientos no se puede operar en un laboratorio en pequeñas ni en grandes cantidades, ya que el cacao pierde todas las características físico-químicas responsables del sabor.

2.6. Factores que influyen en la fermentación

Existen varios factores que influyen en este proceso, entre ellos están:

- Microorganismos
- Temperatura
- Remoción

2.6.1. Microorganismos

La fermentación se subdivide en tres fases, durante la primera fase actúan las levaduras, en la segunda se desarrollan las bacterias lácticas y en la tercera las bacterias acéticas.Al realizar la extracción los granos de cacao, se encuentran estériles, pero son colonizados por una gran variedad de microorganismos provenientes de la misma vaina, de las manos de los manipuladores, de los insectos, de los recipientes usados para el transporte, etc.

En el proceso de fermentación de las semillas del cacao los microorganismos juegan un papel importante.

2.6.1.1. Primera Fase

Los primeros microorganismos que se desarrollan son las levaduras, gracias a las condiciones iniciales en la pulpa del grano de cacao como el ambiente anaeróbico, el bajo nivel de pH.

La fase inicial consiste en una fermentación alcohólica llevada a cabo por las levaduras, pertenecientes a los géneros Saccharomyces spp., Candida, Dedaryomyces, Hansenulaa, Kloeckera, Pichia, Rhodotorula, y Torulopsis.

Las especies encontradas con mayor frecuencia son S. cerevisae, Candida krusei, Kloeckera apiculata, Pichia fermentans, Hansenula anomala y Schizosaccharomyces pombe).

2.6.1.1.1. Levaduras

Son hongos unicelulares que se reproducen asexualmente por gemación (ciclos reproductivos cortos), en los cuales una porción del protoplasma sobresale de la pared celular y forma una protuberancia, la cual aumenta de tamaño y se desprende como una nueva célula de levadura.

Este grupo de microorganismos comprende alrededor de 60 géneros y unas 500 especies.

La forma de la levadura puede ser desde esférica a ovoide, en forma de limón, piriforme, cilíndrica, triangular, e incluso alargada formando un verdadero micelio o un falso micelio. También las especies se diferencian en cuanto a su tamaño, miden de 1-10 µm de ancho por 2-3 µm de longitud.

Entre sus necesidades nutritivas están altas concentraciones de azúcares, elementos minerales y sustancias nitrogenadas.

La gran mayoría de las levaduras son mesófilas, con una temperatura máxima de crecimiento entre 24 y 48ºC. Solo unas pocas (2%) son psicrófilas con una temperatura máxima de crecimiento por debajo de 24ºC. No hay levaduras que puedan crecer a 50ºC.

La mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero prefieren un medio ligeramente ácido con un pH de 4,5 a 6,5.

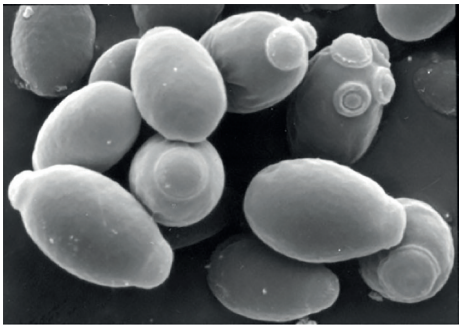


Imagen. 2.3 *Saccharomyces spp*

Las levaduras están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se hallan sobre hojas, flores, frutos, piel, cuero, plumas y tracto digestivo de animales herbívoros y omnívoros, pero el suelo es el mayor reservorio.

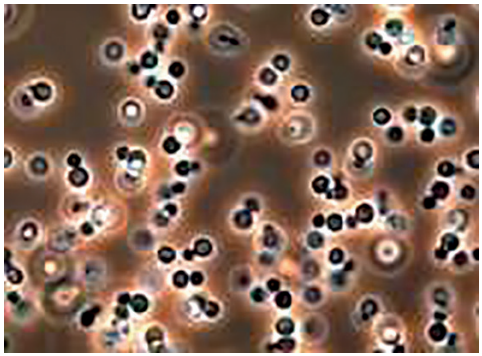


Imagen 2.4 *Hansenula anómala*

2.6.1.2. Segunda Fase

A 50ºC las levaduras dejan de crecer y son sustituidas por bacterias acéticas de los géneros Acetobacter y Gluconobacter, que aprovechan la aireación y el etanol para producir ácido acético.

Éste es un punto clave del proceso pues el ácido acético provoca una disminución mayor del pH que junto con el calor de la fermentación, acaba matando a los brotes del interior de las semillas pero no inactiva a las que han sido producidas durante la formación de dichos brotes. Además, los microorganismos presentes en la fermentación originan ésteres del acetato a partir de ácido acético, que darán al chocolate su peculiar sabor.

Imagen 2.5. Acetobacter aceti enzimas líticas

2.6.1.2.1. Acetobacter

Las acetobacterias o bacterias acéticas (BA) son un grupo de microorganismos Gram (-), que miden entre 0,4 y 4,5 µm de largo y entre 0,4-1 µm de ancho, con forma elipsoidal que pueden presentarse de manera individual, en parejas o en cadenas. A veces presentan flagelos y no pueden formar endosporas como estructura de supervivencia.

Este grupo de microorganismos necesita del oxígeno como aceptor final de electrones, por lo que tienen un metabolismo aerobio obligado. Generalmente pueden utilizar el etanol como fuente de carbono.

El pH óptimo de crecimiento está entre 5 y 6,5, aunque algunas especies pueden llegar a crecer a pH cercanos a 3.

Son parte de este grupo los géneros Acetobacter, Gluconobacter, Gluconacetobacter, Acidomonas, etc.

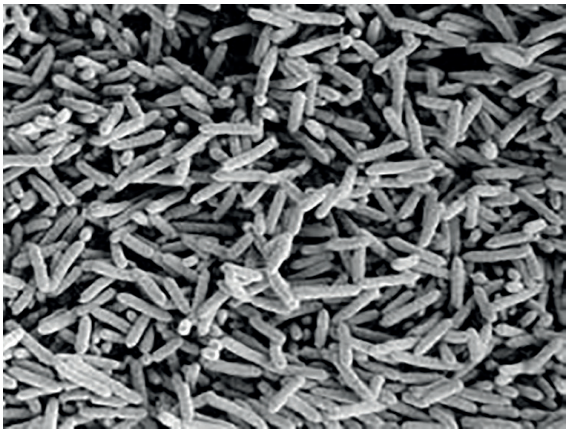


Imagen 2.6. Gluconobacter oxydans

Estas bacterias llegan a la fermentación gracias a los insectos, especialmente a las moscas de la fruta.

2.6.2. Temperatura

La fermentación debe realizarse en un sitio caliente que favorezca el aumento de la temperatura, lejos del recorrido del viento para evitar que la misma descienda y que las partículas que puedan venir en el viento no contaminen nuestra fermentación garantizando un proceso de fermentación completo y parejo.

Para lo cual se puede construir una estructura que proteja al contenedor, de la incidencia directa de los rayos del sol, para evitar que la luz ultravioleta mate a los microorganismos beneficiosos. También se debe evitar que la lluvia llegue a los recipientes fermentadores, dado que la temperatura descendería matando a los microorganismos responsables de los diferentes tipos de fermentación y proporcionaría además humedad innecesaria, ya que la misma es provista por el mucílago de los granos de cacao.

La muerte de las células del cotiledón, que acaece durante el segundo día de fermentación se produce principalmente por la alta temperatura, generada por la actividad de los microorganismos.

2.6.3. Remoción o Volteo

El proceso de volteo tiene el efecto inmediato de enfriamiento, liberación de CO_2 y aumento de la aireación y por consiguiente de la actividad de las bacterias acéticas. El fin de esta actividad es asegurar el grado de fermentación uniforme.

El volteo debe empezar a las 48 horas de iniciada la fermentación, luego se lo hará cada 24 horas, es decir, una vez al día durante los 2 o 3 días restantes dependiendo del tipo cacao fermentado, pero siempre a la misma hora.

2.7. Tipos de fermentación

Fermentador de Madera

Los fermentadores se construyen de madera, porque este material garantiza un cacao de buena calidad, con buen olor, sabor, color y apariencia; se diferencian por su forma y su tamaño.

2.7.1 Fermentación en sacos

La fermentación también se efectúa en costales de polietileno o yute, donde se colocan las almendras, se cierran y se los deja fermentando en el piso. Se los puede colgar para que tengan mejor aireación.

No es muy recomendable debido a que las almendras presentan un elevado porcentaje de granos violáceos y pizarrosos porque la aireación es muy pobre y la humedad alta.

Imagen 2.7. Fermentación de Cacao en sacos

2.7.2. Fermentación en Montón

En este sistema, se coloca sobre el piso una capa de hojas de plátano (musácea, perteneciente a la familia Musaceae) o esteras construidas con materiales vegetales secos, que sirve de base y facilita el drenaje del exudado.

Los granos se colocan sobre las hojas formando rumas que se cubren con el mismo tipo de hojas y en ocasiones con sacos de yute para evitar la fuga de calor.

Los montones no deben estar expuestos directamente al sol, por eso se construyen cobertizos cuya base estará aproximadamente a 80 cm del suelo.

Las remociones se efectuarán a intervalos de 48, 72 y 96 horas, para tener un cacao bien fermentado (por encima del 90 %).

Imagen 2.9. Fermentadores de cacao horizontales

La caída de temperatura se puede regular disminuyendo o aumentando el tamaño de los montones, según la necesidad.

Tiene la ventaja de fermentar cualquier volumen y ocasiona costos bajos.

Los granos que están en el centro del montón son los que se fermentan más rápido y de mejor manera, por lo que es necesario que la remoción se realice de manera homogénea, para que todos los granos se fermenten de manera uniforme.

Imagen 2.10. Fermentadores de madera en disposición de escalera

2.7.3. Fermentación en Cajón

Para este tipo de fermentación se colocan las almendras frescas dentro de cajones fermentadores por un período de 5 días.

La altura de la masa de almendras debe ser nivelada uniformemente y cubrir los cajones con hojas de plátano o costales de yute, a fin de mantener la humedad y conservar el calor desprendido por la fermentación.

La capa de granos frescos no debe superar los 70 centímetros, ya que se corre el riesgo que se compacten, se reduzca la aireación de los granos y se dificulte el volteo.

Existen dos variables que afectan la fermentación en este tipo de fermentador, que son:

La profundidad de la masa de almendras, que debe tener un espesor mínimo de 20 cm y la duración de la fermentación, que debe ser la precisa para el tipo de cacao.

2.7.4. Fermentación en Tambor Rotatorio

Se trata de un tambor usado en otros procesos, al que se le han hecho modificaciones como:

1. Sistema de remoción interna, usando un eje con paletas.
2. Sistema de frenado, para la carga y descarga.

Permite fermentar hasta 250 kg de cacao, que es aproximadamente la producción de una hectárea de cacao.

El tambor necesita de un lugar cubierto con ventilación, con un piso que tenga canales para recoger y drenar el exudado.

Este tipo de fermentador, puede ser cargado y descargado por una sola persona, que puede remover el cacao cada 24 horas sin ayuda, porque las paletas internas hacen todo el trabajo.

Permite obtener mejor calidad y rendimiento del grano fermentado, pues se disminuyen los riesgos de contaminación al ser un barril cerrado, que se abre solo para la carga y descarga.

Imagen 2.11. Fermentador Rotatorio

3. Investigación

ACTIVIDADES DESARROLLADAS

En las muestras de almendras de cada uno de los fermentadores se extrajo a tiempo 0 (inicio del proceso) y luego, cada 12 horas hasta que término la fermentación en cada variedad. Los parámetros que se controló en cada una de estas muestras fue: humedad, pH, acidez, °brix, el índice de fermentación y temperatura. En las muestras del exudado se tomó el primer día de fermentación y se controló: pH, acidez y °brix.

Cinética de Fermentación. - Se analizó ºBrix, pH, Acidez e índice de fermentación. Por estas gráficas se estableció el tiempo de fermentación adecuado para optimizar recursos y mejorar la calidad del grano de cacao.

Además de los análisis anteriores se determinó el contenido de proteasas e invertasa.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

El cacao de las dos variedades, CCN51 y Nacional, con un grado de madurez fisiológica fue seleccionado por los agricultores en las fincas de los socios de Asociación Agroindustrial. La recolección del cacao se la realizo de forma manual por la mañana, tres horas antes del procesamiento.

EL MUESTREO

Las almendras se obtuvo realizando cortes longitudinales y transversales en la mazorca. Se utilizó la cantidad necesaria de frutos para obtener aproximadamente 50 Kg de pulpa para el fermentador rotatorio y 100 kg para el fermentador

horizontal de modo que la altura de la masa a fermentar no supero 80 cm. Se pesó las cortezas para determinar el rendimiento. A continuación se cubrió el fermentador con hojas de plátano y luego con plástico negro para que inicie el proceso de fermentación en el sistema de cajones horizontales. Se realizó dos remociones en el día. En el caso del fermentador rotatorio se utilizó una velocidad de giro de 4 rpm de agitación por media hora dos veces al día

Procedimientos estadísticos.

El diseño experimental que se utilizó para el proceso de fermentación es el factorial a*b con tres réplicas.

Los factores y niveles de estudio fueron:

Factores

A. Variedad de Cacao	A0= Nacional “Arriba”
	A1= CCN51
B. Tipo de fermentador	B0= Horizontal
	B1= Rotatorio [mejoramiento tecnológico]

LOS INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Codificación y preparación de muestras en el laboratorio:

Las muestras de almendras de cacao fermentadas y secas, se codificaron y registraron en el laboratorio. Mediante la técnica de cuarteo se tomó una submuestra de 250 g para los análisis químicos definidos en este estudio. El resto de las muestras se almacenaron en recipientes herméticos en un congelador a -25 °C para trabajos complementarios previstos en el proyecto. Las almendras de cacao fermentadas y secas fueron molidas en un molino ultra centrífugo RETCH Zm 200 y tamizadas con un tamaño de partícula de 355µm, para asegurar la homogenización y toma de muestra para el análisis en el laboratorio.

DESCRIPCIÓN DE CÓMO SE VALIDARON LOS INSTRUMENTOS

Recolección de la muestra:

Materiales y reactivos:

- Cooler
- Hielo seco (CO2)
- Fundas herméticas.
- Estilete o bisturí
- Molino de café o licuadora.

Previo a los análisis, las muestras obtenidas se realizó el siguiente proceso:

1. Retirar la testa con una cuchilla
2. Reducir el tamaño de la almendra con la cuchilla moler en molino de café o licuadora.
3. Tamizar a 42 mallas
4. Pesar la cantidad necesaria para cada análisis.

Es importante realizar el análisis inmediatamente después de que las muestras son molidas y ya que en el caso de los compuestos fenólicos se oxidan con facilidad, independientemente de los métodos de almacenamiento.

Este proceso se realizó 2 veces al día por duplicado.

Temperatura:

Materiales:

- Termómetro digital.
- Cronometro

Se midió la temperatura al tiempo de inicio de la fermentación y luego 2 veces al día hasta el término de la fermentación.

°Brix:

Materiales y equipos:

- Brixómetro
- Agua destilada
- Cuchara o gotero
- Pizeta
- Vaso pequeño

Mezclar bien la muestra y usarla directamente para la determinación.

Enjuagar el prisma con agua.

Tomar una gota de la muestra y colocarla en el refractómetro.

Observar la escala del refractómetro y anotar la lectura indicada.

pH:

Materiales y equipos:

- pH metro
- Agua destilada
- Pizeta
- Buffer pH 4 y 7.
- Balanza
- Probeta 100ml

- Varilla de agitación
- Olla pequeña
- Papel filtro
- Embudos de vidrio
- Matraz de vidrio

Para la determinación del potencial de hidrógeno se utilizaron 5 g de muestra. En un vaso de precipitados se depositó la muestra con 100 mL de agua destilada caliente, la mezcla se sometió a agitación manual durante 30 segundos.

Posteriormente, el sobrenadante se filtró utilizando papel filtro Whatman® #4 auxiliándose con vacío (Bomba de vacío G.M., Modelo: 4C48GX28, 0.5 HP). Se utilizó un potenciómetro (OAKTON, 2500 series) con electrodo de vidrio y 25 mL del filtrado (Nazaruddin et al., 2006).

Acidez titulable:

Materiales y reactivos:

- Agua destilada
- Pizeta
- Bureta
- Probeta 100 ml
- Balón aforado 500ml
- Varilla de agitación
- Vaso de 250ml
- NaOH 0,01N

Se midió empleando 25 mL del filtrado obtenido durante la medición del pH. Los 25 mL de filtrado se titularon con NaOH 0.01 N hasta alcanzar un pH de 8.1 N. (Método AOAC 1995)

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras, son homogeneizadas y por cuarteo se obtuvo una submuestra para los análisis químicos. El resto de la muestra se almacena en bolsas herméticas en un congelador con hielo seco.

Previo a los análisis, las submuestras obtenidas deben seguir el siguiente proceso:

1. Retirar la testa con una cuchilla
2. Reducir el tamaño de la almendra con la cuchilla moler en molino de café
3. Tamizar a 42 mallas
4. Desengrasar la muestra por 16 horas con éter de petróleo
5. Pesar la cantidad necesaria para cada análisis.

Es importante realizar el análisis inmediatamente después de que las muestras son molidas y desengrasadas ya que en el caso de los compuestos fenólicos se oxidan con facilidad, independientemente de los métodos de almacenamiento.

DETERMINACIÓN DE ÍNDICE DE FERMENTACIÓN (IOCCC No 40)

Principio del método

Después de retirar la cáscara, los granos son molidos y tamizados. La muestra es desengrasada con éter de petróleo realizando una posterior extracción de los componentes con una solución de ácido clorhídrico en metanol, en este extracto se determina la Absorbancia a 460 y 525 nm respectivamente con un espectrofotómetro UV-VIS y se establece como índice de fermentación la relación: DO460/DO525

Reactivos

- Éter de Petróleo
- Metanol 99.5% de pureza
- Ácido Clorhídrico fumante. Concentración del 36.5-38%, densidad 1.19

Preparación de reactivos

Solución Ácido Clorhídrico 0.0012M en Metanol: Transferir cuantitativamente 1 mL Ácido Clorhídrico concentrado en un balón volumétrico de 1000mL y completar a volumen con Metanol.

Equipos y materiales

- Molino de café
- Tamiz de 0,5mm de tamaño de partícula
- Dedales de extracción libre de grasa
- Algodón libre de grasa
- Extractor Soxlhet con capacidad de 250ml
- Condensador de reflujo equipo soxlhet
- Balón de destilación de 500ml de capacidad
- Manta de calentamiento
- Platos de cristalización (Cajas Petri) 100 y 150mm de diámetro
- Desecador con silica gel como material desecante
- Erlenmeyer de vidrio de 150ml de capacidad con tapa rosca
- Baño de hielo de disensiones apropiadads
- Pael filtro Whatman No. 4 de diámetro 12,5mm

- Embudos de vidrio
- Pipetas volumétricas, capacidad 4ml
- Balones volumétricos, 25ml de capacidad con uniones de vidrio
- Balanza analítica de precisión
- Espectrofotómetro UV- VIS

Procedimiento

Desengrasado de la muestra:

a) Transferir alrededor de 20g de material de prueba en un cartucho de extracción y rellenarlo con una mota de algodón para cubrir el polvo y poner el dedal en el extractor Soxhlet.

b) Transferir una suficiente cantidad de solvente 300ml en el balón y conectar el balón con el equipo Soxlhet. Juntar el condensador del reflujo al extractor.

c) Colocar el sistema completo en la fuente de calentamiento y extraer el polvo del dedal al menos durante 16 horas. Desconectar el balón del extractor y transferir el polvo desengrasado desde el dedal a un plato de cristalización (caja Petri) de 100ml.

d) Secar el polvo en un desecador por lo menos durante 24 horas.

Extracción de la Muestra.

a) En un erlemeyer de 125 mL pesar con aproximación de 0,1mg, cerca de 2 g de muestra desengrasada.

b) Adicionar 50 mL de solución Ácido Clorhídrico en Metanol.

c) Conducir la muestra a la equipo de extracción y agitar ocacionalmente por 45 minutos en un baño de hielo a 0ºC.

d) Filtrar el extracto a través de papel Whatman Nº 4.

e) Tomar cuantitativamente 4 mL del filtrado en un balón de 25 mL y llevar a volumen con la solución de Ácido Clorhídrico en Metanol.

Medida espectrofotométrica

a) Ajustar el equipo en la opción de fotometría a las longitudes de onda de 460 y 525nm.

b) Utilizando el sipper medir la absorción del blanco (solución HCL-MeOH) y de las muestras a dichas longitudes de onda.es importante sacar un espectro de una muestra para así confirmar la máxima absorción de muestra.

c) Pasar una alícuota de la solución a una cubeta de vidrio y leer en el Espectrofotómetro UV-VIS en la opción fotometría bajo las siguientes condiciones:

- Longitud de Onda: 460 y 525 nm.
- Temperatura: ambiente
- Slit: 0.2 nm

Cálculos y expresión de los resultados

Los resultados se expresan utilizando la siguiente fórmula:

IF = A460/B525

IF = Índice de Fermentación

A460 = Absorbancia de la solución a 460 nm

B525 = Absorbancia de la solución a 525 nm

OBSERVACIONES

Los valores encontrados pueden ponerse en una escala correspondiente a diferentes grados de fermentación, la cual se ha establecido en función de la experiencia/práctica del usuario, y que está en dependencia del origen geográfico de la almendra.

Índice de Fermentación	Grado de Fermentación
IF <	Fermentación Insuficiente
1 <IF< 1,2	Fermentación Correcta
IF> 1,2	Sobre fermentado

Índice de Fermentación de acuerdo a Gourieva y Tserrevitinov (1979)
Índice de fermentación (IF): Relación D.O. (460 nm)/D.O. (525 nm)
El IF se determinó de acuerdo al método descrito por Gourieva y Tserrevitinov (1979).

En este procedimiento 0,5g de granos de cacao molidos son extraídos con 50 ml de la mezcla de metanol:ácido clorhídrico (97:3). El homogeneizado se dejó reposar en refrigeración (8°C) durante 16 - 19 horas y luego se filtró al vacío.

El filtrado se llevó hasta completar 50ml en un matraz volumétrico con la solución metanol:ácido clorhídrico

El filtrado se leyó por separado en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 460nm y 525nm de absorbancia respectivamente. El índice de fermentación de las muestras fueron obtenidas por el cálculo de la relación de absorbancia a 460nm y 530nm.

DETERMINACIÓN DE TANINOS

Método del tungsto-molíbdico-fosfórico para cuantificar taninos (descrito por Miranda M en el Manual de prácticas de laboratorio de análisis farmacognóstico. 1992:54-5)

Se agitan 10 g de muestra con 500 mL de etanol al 50 % durante 6 h, se deja en reposo 8 h y se agita nuevamente por 30 min, para posteriormente filtrar. Se transfieren 3 mL del filtrado a un matraz aforado de 50 mL y se diluye con agua destilada hasta enrase (Sm). Finalmente se preparan matraces aforados de 50 mL, los cuales contendrán:

Reactivos	Blanco	Patrón	Muestra
Sm	-	-	1,0 mL
Solución de referencia de ácido tánico	-	3,0 mL	-
Agua destilada	5,0 mL	2,0 mL	4,0 mL
Reactivo para taninos	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
Se agita y se deja en reposo 5 min			
Solución de carbonato de sodio al 20 %	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Se completa con agua destilada hasta enrase, se mezcla bien y se lee cada uno a 700 nm.

Solución de referencia de ácido Tánico

Se disuelven 25 mg de ácido tánico en 100 mL de agua destilada, de ahí se cogen 20 mL y se completa volumen hasta 100 mL.

Reactivo para taninos

10 g de tungstato de sodio dihidratado, 0,2 g de ácido fosfomolíbdico y 5 mL de ácido fosfórico al 85 % en 75 mL de agua destilada. Se refluja 2 h y después se completa a 100 mL con agua destilada.

La expresión para los cálculos es la siguiente:

$$X = \frac{Am \times P \times 1\,000 \times 100}{Ap \times PM \times (100\text{-}p)}$$

X: contenido de taninos en la droga (%)

P: masa de la sustancia de referencia (g)

Am: absorbancia de la muestra (nm)

Ap: absorbancia de la solución de referencia (nm)

PM: masa de la droga (g)

p: humedad de la droga (%)

DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES

Método espectrofotométrico para cuantificar flavonoides totales expresados como quercetina, descrito por Kostennikova Z1 (este método modificado por Méndez G en su Tesis de Maestría: Estudio farmacognóstico y fitoquímico preliminar de Cymbopogon citratus (DC) stapf y sus extractos, 1996:36-8):

Materiales y reactivos

- Ácido sulfúrico
- Etanol grado reactivo
- Quercetina
- Vasos de precipitación
- Papel filtro Whatman N°4
- Balón volumétrico de 100mL
- Espectrofotómetro UV-VIS

Procedimiento

a) Se refluja 0,5 g de muestra 2 h con 20 mL de ácido sulfúrico al 10 % y 20 mL de etanol al 50 %, luego se enfría y se filtra con ayuda de vacío.

b) El residuo se lava con 30 mL de etanol al 50 % para desecharlo finalmente.

c) El filtrado se evapora en baño de agua hasta la mitad del volumen inicial, se enfría sobre baño de hielo durante 30 min y luego se filtra, lavando el precipitado formado con 4 porciones de 10 mL de agua destilada fría (10-15 °C).

d) Se elimina el filtrado y los lavados, y el residuo tanto del filtro como del recipiente se disuelve con 70 mL de etanol al 96 %, calentando previamente a 50 °C; la solución se pasa a un volumétrico de 100 mL y se completa volumen con etanol al 96 % (solución muestra).

e) Posteriormente se leen las absorbancias a 258 nm.

f) Como patrón se empleó 0,04 g de quercetina, los cuales se disolvieron con etanol al 96 % hasta completar un volumen de 50 mL; de esta solución se toma 1 mL y se diluye a 100 mL con etanol al 50 %.

Cálculos

El blanco consistió en una solución de etanol al 50 %. La expresión empleada para el cálculo fue la siguiente:

$$X = \frac{Am \times P_R \times 5}{A_R} \times 100$$

X: contenido de flavonoides totales expresados como quercetina (%)

Am: absorbancia de la solución muestra (nm)

PR: peso de la sustancia de referencia (g)

AR: absorbancia de la solución de referencia (nm)

DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

Principio del método

Los Polifenoles Totales del polvo de cacao son extraídos con una solución acuosa de metanol al 70%, mediante agitación magnética continua por 45 minutos, el extracto obtenido se filtra, se toma una alícuota del mismo y se realiza una reacción colorimétrica con el reactivo Folin&Ciocalteu obteniendo una coloración azul, la misma que es cuantificada en un Espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de Onda de 760nm.

Reactivos

- Metanol grado reactivo al 99.5%
- Ácido Gálico Monohidratado
- Reactivo de Folin&Ciocalteu
- Carbonato de sodio
- Agua destilada
- Éter de Petróleo

Preparación de reactivos

- Solución carbonato de sodio al 20%: Transferir cuantitativamente 20g de Carbonato de Sodio en un balón volumétrico de 100ml disolver y completar a volumen con agua bidestilada.
- Solución acuosa de metanol: Transferir cuantitativamente 700ml de metanol en un balón volumétrico de 1000mL completar a volumen con agua bidestilada (densidad de la solución 0.872g/mL)

- Solución estándar primario de ácido gálico (200ppm): Transferir cuantitativamente 0.020g de ácido gálico, en un balón volumétrico de 100mL, disolver y completar a volumen con agua destilada.

Equipos y Materiales

- Papel filtro Whatman N°4
- Balones volumétricos de 100mL
- Balanza análitica de precisión 0.1mg
- Plancha magnética
- Pipetas volumétricas de 5 y 10mL
- Embudos de vidrio para filtración 12cm de diámetro
- Plancha de calor
- Espectrofotómetro UV-VIS
- Agitadores magnéticos
- Tubos de ensayo capacidad de 15mL
- Micropipeta automática de 100 a 1000uL
- Puntas para micropipeta automática

Para la operación de pesado de la muestra se debe tomar en consideración tres cifras decimales. El polvo de cacao se obtiene siguiendo el método de preparación de muestras. Para este análisis se utilizó la muestra de polvo de cacao desengrasada

Soluciones estándar para curva de calibración

A partir de la solución estándar primario de 200ppm se realiza la curva tomando en consideración la siguiente tabla:

Volumen de estándar	Volumen de agua	Concentración
0,25	9,975	5
0,50	9,950	10
2,00	8,00	40
4,00	6,00	80
5,00	5,00	100
7,00	3,00	140

Extracción de la muestra

a) En un Erlenmeyer de 125mL pesar 1g de muestra desengrasada.

b) Adicionar 75mL de solución acuosa de metanol al 70% y colocar un agitador magnético.

c) Conducir la muestra a la plancha de agitación y agitar por 45 minutos a temperatura ambiente.

d) Filtrar el extracto a través de papel Whatman N°4 en un balón volumétrico de 100mL, lavar el filtrado y aforar con solución acuosa de metanol al 70%.

Cuantificación en el Espectrofotómetro UV-VIS

a) Transferir cuantitativamente 1mL de extracto a un tubo de ensayo, añadir 9mL de agua destilada (dilución A)

b) Tomar 1mL de dilución A, añadir 6mL de agua destilada y 1mL de reactivo de Folin&Ciocalteu, luego de tres minutos añadir 2mL de la solución de carbonato de sodio al 20%, inmediatamente agitar en vortex y calentar en baño maría a 40°C por 2 minutos (Este procedimiento se realiza tanto para las muestras como para los estándares)

c) Pasar la solución a una cubeta de vidrio y cuantificar en el Espectrofotómetro UV-VIS bajo las siguientes condiciones:

- Longitud de onda 760nm
- Temperatura ambiente
- Slit: 0,2nm
- Cálculos y expresión de los resultados

La cuantificación se realiza utilizando una curva de calibración realizada previamente en el equipo y utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{mg}{g}\text{Ácido Gálico} = \frac{a * b * d * f}{p}$$

a = Concentración de ácido gálico obtenida a partir de la curva de calibración (mg/L)

b = Volumen total de extracto (100mL)

d = Factor de dilución (10)

f = Factor para transformar unidades (f = 0.001)

p = Peso de la muestra g

LUGAR DE EJECUCIÓN

Parámetros tales como temperatura, pH, acidez y °Brix se determinó en situ [en campo], inmediatamente después de extraída la muestra, los demás análisis que requirieron la utilización de instrumentos y equipos más complejos se realizó en

los laboratorios de la FCIAL; para estos análisis, las muestras extraídas fueron congeladas y transportadas en un termo. El grano fermentado y exudado se secó a 60°C, en una estufa de convección con regulación de temperatura, durante 72 horas, para evitar cambios indeseables y variaciones en el contenido de taninos, flavonoides y proteínas.

EL TIEMPO

La recolección de muestras se lo realizó en el mes de octubre del año 2014.

Planteamiento de la Hipótesis

Para las almendras

Hipótesis nula

Ho: La variedad de cacao y el tipo de fermentador no inciden en la cinética de fermentación y en la calidad del producto.

Hipótesis alternativa

Ha: La variedad de cacao y el tipo de fermentador inciden en la cinética de fermentación y en la calidad del producto.

Para el exudado

Hipótesis nula

Ho: La variedad de cacao y el tipo de fermentador no inciden en la actividad enzimática del exudado del cacao.

Hipótesis alternativa

Ha: La variedad de cacao y el tipo de fermentador inciden en la actividad enzimática del exudado del cacao.

RESULTADOS

INTERPRETACIÓN DE LOS VALORES OBTENIDOS DE ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS

pH

Los valores que se obtuvo de pH en la pulpa y almendra con relación a la variedad de cacao y tipo de fermentador durante la recolección de muestras en la Asociación, indican que existe diferencia significativa y que influyó directamente en las muestras en función del tiempo de fermentación para cada tratamiento como se observó en la figura C1 y C2 (Anexo C).

Se determinó que para el tratamiento a0b0 tuvo un pH inicial en pulpa de 3,22 a las 0 horas notándose que existió un aumento de pH en función del tiempo de fermentación en cada medición que se realizó, en la medición final se obtuvo un valor de 3,58 Tabla A1 (Anexo A). Mientras que en los valores en almendra se obtuvo un pH inicial de 6,62 se observó que mientras el tiempo de fermentación aumento el pH disminuyo en cada medición que se realizó, la medición final dio un valor de 4,81 Tabla A9 (Anexo A).

Para el tratamiento a0b1 se determinó un valor de pH inicial en pulpa de 3,22, se observó que el pH aumento durante el tiempo de fermentación, alcanzó un valor final de 3,85 Tabla A2 (Anexo A); mientras que el pH en almendra tuvo un valor inicial de 6,50 donde se observó que el valor de pH disminuyo en función del tiempo de fermentación, se obtuvo un valor final de 4,65; notándose que en este tratamiento hubo un mayor incremento en el pH en pulpa y un mayor descenso del pH en almendra, Tabla A10 (Anexo A).

Se determinó que para el tratamiento a1b0 tuvo un pH inicial en pulpa de 3,36 a las 0 horas notándose que existió un aumento de pH en función del tiempo de fermentación en cada medición que se realizó, en la medición final se obtuvo un valor de 4,22 Tabla A3 (Anexo A). Mientras que en los valores en almendra se obtuvo un pH inicial de 6,57 en el que mientras el tiempo de fermentación aumento el valor disminuyo a 4,41 pero en la última medición aumento a 4,69 lo que indico que la almendra se sobrefermento. Tabla A11 (Anexo A).

Para el tratamiento a1b1 se determinó un valor de pH inicial en pulpa de 3,41, se observó que el pH aumento durante el tiempo de fermentación, alcanzó un valor final de 3,84 Tabla A4 (Anexo A); mientras que el pH en almendra tuvo un valor inicial de 6,58 donde se observó que el valor de pH disminuyo en función del tiempo de fermentación, el valor disminuyo a 4,38 pero en la última medición aumento a 4,88 lo que indico que la almendra se sobrefermento. Tabla A12 (Anexo A).

Humedad

Los valores obtenidos de % de humedad de cada uno de los tratamientos de muestras recogidas en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL, se realizó por duplicado en función del tiempo de fermentación Tabla A1, A2, A3 y A4 (Anexo A) y Figura C3 (Anexo C).

Se determinó que para el tratamiento a0b0 tuvo un % de humedad inicial en almendra fue de 37,72%, se observó que mientras el tiempo de fermentación aumento, la humedad disminuyo en cada medición que se realizó hasta llegar a 34,16%; para luego subir el % de humedad, la medición final dio un valor de 38,49% al terminar la fermentación a las 60 horas. Tabla A9 (Anexo A).

Para el tratamiento a0b1 se determinó un valor de % de humedad en almendra con un valor inicial de 35,95 donde se observó que el valor de % de humedad disminuyo en función del tiempo de fermentación en cada medición que se realizó hasta llegar a 34,43%, luego aumento hasta un valor final de 37,88% a las 60 horas Tabla A10 (Anexo A).

Se determinó que para el tratamiento a1b0 tuvo un % de humedad inicial en almendra de 35,93%, se observó que mientras el tiempo de fermentación aumento, la humedad disminuyo en cada medición que se realizó hasta llegar a 34,97%; después el % de humedad aumento, dando un valor de 37,08% donde el tiempo de fermentación fue el óptimo a las 49,5 horas, a partir de esta medición el % de Humedad volvió a disminuir por motivo de la sobre fermentación en la almendra, la medición final dio un valor de 36,04% Tabla A11 (Anexo A).

Para el tratamiento a1b1 se determinó un % de humedad inicial en almendra de 34,27%, se observó que mientras el tiempo de fermentación aumento, la humedad disminuyo en cada medición que se realizó hasta llegar a 33,29%; después el % de humedad aumento, dando un valor de 33,74% donde el tiempo de fermentación fue el óptimo a las 39,5 horas, a partir de esta medición el % de Humedad volvió a aumentar y disminuir por motivo de la sobre fermentación en la almendra, la medición final dio un valor de 36,92% Tabla A12 (Anexo A)

Acidez

Los valores obtenidos de % Ac. Acético de cada uno de los tratamientos de muestras recogidas en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL, se realizó por triplicado en función del tiempo de fermentación Tabla A1, A2, A3 y A4 (Anexo A) y Figura C4 (Anexo C).

Se determinó que el tratamiento a0b0 tuvo un % Ac. Acético inicial en almendra fue de 0,008%, se observó que mientras el tiempo de fermentación aumento, la acidez se incrementó en cada medición que se realizó hasta la medición final con un valor de 0,115% al terminar la fermentación a las 60 horas. Tabla A9 (Anexo A).

Para el tratamiento a0b1 se determinó un valor de % Ac. Acético en almendra con un valor inicial de 0,008% donde se observó que el valor de acidez aumento en función del tiempo de fermentación en cada medición con un valor final de 0,142% a las 60 horas Tabla A10 (Anexo A).

Se determinó que el tratamiento a1b0 tuvo un % Ac. Acético inicial en almendra de 0,011%, se observó que mientras el tiempo de fermentación aumento, la

acidez se incrementó en cada medición que se realizó hasta la medición final con un valor de 0,223% al terminar la fermentación a las 80,5 horas. Tabla A10 (Anexo A).

Para el tratamiento a1b1 se determinó un valor de % Ac. Acético en almendra un valor inicial de 0,009% donde se observó que el valor de acidez aumento en función del tiempo de fermentación en cada medición con un valor final de 0,209% a las 69,5 horas Tabla A11 (Anexo A).

Los valores obtenidos de % Ac. Acético en exudado de cada variedad de cacao recogidas en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL, se realizó por triplicado al inicio de la fermentación se muestra los valores promedio en la Tabla A13 (Anexo A).

Se determinó que en el exudado de la variedad nacional hubo un % Ac. Acético promedio inicial de 0,008%, y para la variedad CCN51 un % de ácido Acético promedio inicial de 0,007% reportados en la Tabla A13 (Anexo A).

El ácido acético se produce por síntesis bioquímica de la oxidación de etanol, durante las primeras etapas de la fermentación (Schwan, 2004). Esto concuerda con lo encontrado en este trabajo, ya que la concentración de ácido acético aumentó significativamente en el tiempo de fermentación.

Grasa

Los granos de cacao están constituidos principalmente por lípidos, la grasa del cacao presenta características físicas y químicas que le imparten propiedades funcionales específicas, por lo que es muy demandada por la industria alimentaria (Liendo, 1997). En este trabajo, el cacao fresco de variedad Nacional presento un contenido de grasa 47,81%, contenido que durante la fermentacion tuvo un descenso de 0,64% para el tratamiento a0b0 Tabla A5 y A9 (Anexo A) y un descenso de 0,13% para el tratamiento a0b1 Tabla A6 y A10 (Anexo A), mientras que en la variedad CCN51 el cacao fresco presento un contenido de grasa de 49,72%, contenido que durante la fermentacion tuvo un descenso de 1,42% para el tratamiento a1b0 Tabla A7 y A11 (Anexo A) y un descenso de 3,36% para el tratamiento a1b1 Tabala A8 y A12 (Anexo A), sin embargo, este desenso no

fue estadisticamente significativo, no asi en comparacion con la variedad que si es significativo al igual que no huba mayor significancia en cuanto al tipo de fermentador. Tabla B1, B2, B3 y Figura B1 (Anexo B).

Índice De Fermentación

Los valores de absorbancia obtenidos para índice de fermentación de cada uno de los tratamientos de muestras recogidas en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL, se realizó en función del tiempo de fermentación Tabla A5 hasta A8 (Anexo A) y Figura C5 (Anexo C).

Se determinó que el tratamiento a0b0 tuvo un grado de fermentación inicial de 0,72 se observó que mientras el tiempo de fermentación aumento, el grado fermentación se incrementó en cada medición que se realizó hasta la medición final con grado de fermentación de 1,02 que indica que tuvo una fermentación correcta a las 60 horas. Tabla A9 (Anexo A).

Para el tratamiento a0b1 se determinó un grado de fermentación inicial de 0,72 se observó que mientras el tiempo de fermentación aumento, el grado fermentación se incrementó en cada medición que se realizó hasta la medición final con grado de fermentación de 1,04 que indica que tuvo una fermentación correcta a las 60 horas. Tabla A10 (Anexo A).

Se determinó que para el tratamiento a1b0 tuvo un grado de fermentación inicial en almendra de 0,83, se observó que mientras el tiempo de fermentación aumento, el grado fermentación se incrementó en cada medición que se realizó hasta obtener un grado de fermentación correcto de 1,01 a las 49,5 horas, las demás muestras que se tomó dio un grado de sobre fermentación Tabla A11 (Anexo A).

Para el tratamiento a1b1 se determinó un grado de fermentación inicial en almendra de 0,83, se observó que mientras el tiempo de fermentación aumento, el grado fermentación se incrementó en cada medición que se realizó hasta obtener un grado de fermentación correcto de 1,00 a las 49,5 horas, las demás muestras que se tomó dio un grado de sobre fermentación Tabla A12 (Anexo A)

En cuanto al análisis estadístico se observó que existe diferencia significativa tanto para la variedad de cacao como para el tipo de fermentador Tabla B4, B5, B6 y Figura B2 (Anexo B), lo que nos da como resultado que la variedad nacional tiene un mayor tiempo de fermentación independientemente del tipo de fermentador utilizado; lo que concuerda con (Braudeau, 1970), (Moreno L. S., 1989), indican que el cacao Nacional presenta una condición particular y necesita una fermentación más larga que el criollo.

Flavonoides

Los valores obtenidos de absorbancias en la determinación flavonoides de cada uno de los tratamientos de muestras recogidas en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL, se realizó en función del tiempo de fermentación Tabla A5 hasta A8 (Anexo A) y Figura C6 (Anexo C).

Se determinó que el tratamiento a0b0 tuvo un % de quercetina inicial de 19,34% se observó que mientras el tiempo de fermentación aumento, el % de quercetina se incrementó en cada medición que se realizó hasta la medición final con un % de quercetina de 23,70% que indica que tuvo una fermentación correcta a las 60 horas. Tabla A9 (Anexo A).

Para el tratamiento a0b1 se determinó un % de quercetina inicial de 19,34% se observó que mientras el tiempo de fermentación aumento, el % de quercetina se incrementó en cada medición que se realizó hasta la medición final con un % de quercetina de 20,37% que indica que tuvo una fermentación correcta a las 60 horas. Tabla A10 (Anexo A).

Se determinó que para el tratamiento a1b0 tuvo un % de quercetina inicial de 19,65%, se observó que mientras el tiempo de fermentación aumento, el % de quercetina aumento en cada medición que se realizó donde el tiempo de fermentación óptimo fue a las 49,5 horas con 20,17%, notándose que él % de quercetina llegó a 20,31% a las 60 horas; después el % de quercetina disminuyo, a un valor de 18,61%, Tabla A11 (Anexo A).

Se determinó que para el tratamiento a1b1 tuvo un % de quercetina inicial de 19,65%, se observó que mientras el tiempo de fermentación aumento, el % de quercetina aumento en cada medición que se realizó donde el tiempo de fermentación óptimo fue a las 49,5 horas con 21,56%, notándose que él % de quercetina disminuyo, a un valor de 19,94%, Tabla A12 (Anexo A).

En cuanto al análisis estadístico se observó que existe diferencia significativa tanto para la variedad de cacao como para el tipo de fermentador Tabla B7, B8, B9 y Figura B3 (Anexo B), lo que nos da como resultado que la variedad nacional tiene un mayor % de quercetina independientemente del tipo de fermentador utilizado.

En el análisis de flavonoides de exudado en las dos variedades de cacao recogidas en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL, se muestra en la Tabla A13 (Anexo A).

Se determinó que la variedad nacional tuvo un % de quercetina inicial de 17,23%, mientras que para la variedad CCN51 el % de quercetina fue 14,11% Tabla A13 (Anexo A), (Gil, 2010) menciona que los flavonoides presentes en el cacao poseen una biodisponibilidad elevada, la quercetina, flavonoide que aparece en el cacao, indican que la capacidad antioxidante de este compuesto inhibiría la oxidación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) que reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares.

Polifenoles

El contenido de polifenoles se evaluó a los 4 tratamientos, los resultados de las absorbancias a 760nm se presentan en la Tabla A5 hasta A8 y los resultados de contenido de polifenoles en la Figura C7 (Anexo C).

Observando los resultados para el tratamiento a0b0 se establece que el contenido de polifenoles inicial obtenido es de 13,81 mg ácido gálico/g cacao desengrasado y un contenido de 53,63 mg ácido gálico/g cacao desengrasado a las 60 horas de fermentación. Tabla A9 (Anexo A).

Para el tratamiento a0b1 se determinó un que el contenido de polifenoles inicial de 16,26 mg ácido gálico/g cacao desengrasado y un contenido de

47,84 mg ácido gálico/g cacao desengrasado a las 60 horas de fermentación. Tabla A10 (Anexo A).

Se determinó que para el tratamiento a1b0 que el contenido de polifenoles inicial de 13,63 mg ácido gálico/g cacao desengrasado y un contenido de 33,81 mg ácido gálico/g cacao desengrasado a las 49,5 horas de fermentación, llegando hasta 37,84 mg ácido gálico/g cacao desengrasado a las 60 horas, observando que cuando se sobre fermenta el contenido disminuye hasta 33,28 mg ácido gálico/g a las 80,5 horas, Tabla A11 (Anexo A).

Se determinó que para el tratamiento a1b1 que el contenido de polifenoles inicial de 13,63 mg ácido gálico/g cacao desengrasado y un contenido de 43,28 mg ácido gálico/g cacao desengrasado a las 49,5 horas de fermentación, llegando hasta 45,04 mg ácido gálico/g cacao desengrasado a las 60 horas, observando que cuando se sobre fermenta el contenido disminuye hasta 26,61 mg ácido gálico/g a las 80,5 horas, Tabla A12 (Anexo A).

El resultado que se obtuvo permitió evaluar el proceso de fermentación entre las dos variedades y el tipo de fermentador indicando que la mayor parte de almendras de cacao llegaron al contenido óptimo de polifenoles.

Se realizó un análisis de estadístico aplicado a los tratamientos se observó que existe diferencia significativa para la variedad de cacao Tabla B10, B11 (Anexo B) y que para el tipo de fermentador no existió diferencia significativa Tabla B12 y Figura B3 (Anexo B), lo que nos da como resultado que la variedad nacional tiene un mayor % de polifenoles independientemente del tipo de fermentador utilizado. Este análisis permite establecer que la variación en el contenido de polifenoles se atribuye a la variedad de cacao y que este parámetro es influenciado directamente por el tiempo de fermentación, debido a que los polifenoles sufren procesos de oxidación y disminución por difusión (Wollgast, 2000).

Taninos

En cuanto análisis de taninos se los realizo en granos liofilizados al mejor tratamiento en la variedad nacional a0b1 al inicio y final del proceso de fermentación

en el INIAP (INSTITUTO AUTONOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS) los resultados se reportan en la Tabla A14, con valores de 36,61 mg/ Ac. Gálico/g al inicio de la fermentación y de 33,51 mg/ Ac. Gálico/g al final de la fermentación, estos compuestos participan en reacciones de polimerización oxidativa y de oscurecimiento (Cros y Jeanjean, 1995), reacciones que son afectadas positivamente por las temperaturas más elevadas que se alcanzan al fermentar mazorcas almacenadas (Rohan, 1964; Braudeau, 1970).

INTERPRETACIÓN DE LOS VALORES OBTENIDOS DE ANÁLISIS ENZIMÁTICOS

Durante la fermentación ocurren cambios en las proteínas relacionados con el incremento de la temperatura y de la acidez, factores que causan la muerte del embrión y la ruptura de las paredes celulares, permitiendo que las enzimas entren en contacto con sus respectivos sustratos (Cros E, 1995).

Los extractos se realizó por duplicado con polvo liofilizado de almendra en cada tratamiento, el cual fue tratado con acetona, el extracto de la enzima fue preparado un día antes del análisis. Los pesos iniciales de polvo liofilizado y pesos finales del polvo liofilizado tratado con acetona se observan en la Tabla E 1 (Anexo D).

Endoproteasa

La endoproteasa aspártica es responsable para que se produzca la hidrolisis inicial de la globulina almacenada como proteína durante el proceso de fermentación (Carl E Hansen, 1998), se realizó una curva de calibración a partir de tirosina donde se obtuvo los valores mostrados en la Tabla D 2 (Anexo D) y la ecuación entre absorbancia vs la concentración de tirosina como se muestra en la Figura D 1 (Anexo D).

Los valores que se obtuvo para los cálculos de actividad enzimática endoproteasa con relación a la variedad de cacao y tipo de fermentador en muestras recolectadas en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL se detallan en la Tabla D3, D4 y D5 (Anexo D).

Se determinó que para el tratamiento a0b0 tuvo una actividad enzimática inicial promedio de 450,9703 ± 1,62 UI g-1 DW (Unidades de endoproteasa por gramo de polvo liofilizado en peso seco) a las 0 horas, notándose que la endoproteasa fue estable durante la fermentación con un valor promedio final de 391,4852 ± 2,27 UI g-1 DW a las 60 horas Tabla D5 (Anexo D).

Para el tratamiento a0b1 se determinó un valor de una actividad enzimática inicial promedio de 454,6340 ± 4,32 UI g-1 DW a las 0 horas, se observó que la endoproteasa fue estable durante el tiempo de fermentación, con valor promedio final de 410,0714 ± 14,10 UI g-1 DW a las 60 horas Tabla D 5 (Anexo D).

Se determinó que para el tratamiento a1b0 la actividad de endoproteasa inicial fue 438,3281 ± 1,38 UI g-1 DW a las 0 horas, se observó que la endoproteasa fue estable durante el tiempo de fermentación con un valor final de 385,2497 ± 0,14 UI g-1 DW a las 80,5 horas Tabla D5 (Anexo D).

Se determinó que para el tratamiento a1b1 la actividad de endoproteasa inicial fue 448,5684 ± 2,56 UI g-1 DW a las 0 horas, se observó que la endoproteasa fue estable durante el tiempo de fermentación con un valor final de 402,1020 ± 3,85 UI g-1 DW a las 80,5 horas Tabla D5 (Anexo D).

Los resultados que se obtuvo permitió evaluar la actividad enzimática de endoproteasa aspártica que genera compuestos considerados como precursores del aroma específico del cacao fermentado (Ligia Ortiz de Bertorelli, 2006), durante el proceso de fermentación entre las dos variedades y el tipo de fermentador se obtuvo un mejor resultado en el fermentador rotativo para las dos variedades.

Invertasa

Las dificultades en la extracción de una invertasa activa desde el cotiledón pueden explicar la falta de mediciones confiables en la literatura (Carl E Hansen, 1998), se realizó una curva de calibración a partir de tirosina donde se obtuvo los valores mostrados en la Tabla D6 (Anexo D) y la ecuación entre absorbancia vs la concentración de glucosa como se muestra en la Figura D2 (Anexo D).

Los valores que se obtuvo para los cálculos de actividad enzimática invertasa con relación a la variedad de cacao y tipo de fermentador en muestras recolectadas en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL se detallan en la Tabla D7, D8 y D9 (Anexo D).

Se determinó que para el tratamiento a0b0 tuvo una actividad enzimática inicial promedio de 0,0277 ± 0,0006 UI g-1 WD (Unidades de invertasa por gramo de polvo liofilizado en peso seco) a las 0 horas, notándose que la invertasa fue inactivada durante la fermentación con un valor promedio final que no representa significancia de 0,0009 ± 0,0010 UI g-1 WD a las 60 horas Tabla D9 (Anexo D).

Para el tratamiento a0b1 se determinó un valor de una actividad enzimática inicial promedio de 0,0282 ± 0,0012 UI g-1 WD a las 0 horas, se observó que la invertasa fue inactivada durante el tiempo de fermentación, con valor promedio final no significativo de 0,0007 ± 0,0004 UI g-1 WD a las 60 horas Tabla D9 (Anexo D).

Se determinó que para el tratamiento a1b0 la actividad de invertasa inicial fue 0,0230 ± 0,0019 UI g-1 WD a las 0 horas, se observó que la invertasa fue inactivada durante el tiempo de fermentación con un valor final no representativo de 0,0006 ± 0,0009 UI g-1 WD a las 80,5 horas Tabla D9 (Anexo D).

Se determinó que para el tratamiento a1b1 la actividad de invertasa inicial fue 0,0266 ± 0,0013 UI g-1 WD a las 0 horas, se observó que la inertasa fue inactivada durante el tiempo de fermentación con un valor final no representativo de 0,0005 ± 0,0004 UI g-1 WD a las 80,5 horas Tabla D9 (Anexo D).

Los resultados que se obtuvo permitió evaluar la actividad enzimática de invertasa que indica que la concentración de sacarosa es disminuida por hidrólisis enzimática, reacción que continúa hasta que la enzima invertasa es inactivada por el incremento de la temperatura y la pérdida de humedad (Puziah et al., 1999), durante el proceso de fermentación entre las dos variedades y el tipo de fermentador se obtuvo resultados con mínimas diferencias en los valores al terminar la fermentación lo cual nos indica que no hay diferencia significativa en las variedades y el tipo de fermentador.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

Los factores en estudio influyeron positivamente sobre la calidad del cacao, los cambios físicos y químicos se inician desde el comienzo de la fermentación con tendencias definidas para cada una de las variables analizadas.

Se encontró en los análisis realizados, que el fermentador rotatorio presento la mejor fermentación entre los dos fermentadores evaluados. A diferencia del tipo de fermentador, el tiempo de fermentación provocó modificaciones físicas y químicas que representaron diferencias estadísticas en las dos variedades, observándose que al aumentar el tiempo de fermentación se incrementa los valores de flavonoides y polifenoles principalmente.

Las mejores características de calidad se presentaron en cacao Nacional, las que se obtuvieron a las 60 horas de fermentación tanto para el fermentador horizontal y rotatorio, se observó que en el horizontal hubo un mayor valor de flavonoides y polifenoles, pero en el rotatorio hubo un índice de fermentación mejor.

Mientras que para la variedad CCN51 a las 49,5 horas el fermentador rotatorio presento un mayor valor de flavonoides y de polifenoles con un mejor grado de fermentación en comparación con el horizontal.

La actividad enzimática en Endoproteasa aspártica se mantuvo estable obteniendo un mejor resultado en el fermentador rotativo y la actividad enzimática de invertasa fue significativamente inactivada durante la fermentación en los dos tipos de fermentadores

Finalmente se concluye que para la fermentación de cacao Nacional es mejor el fermentador horizontal y que para la variedad CCN51 es mejor el fermentador rotatorio.

RECOMENDACIONES

Producir estos tipos de ensayos en dos épocas definidas en el año, para determinar y corroborar la influencia de la temperatura y humedad relativa del ambiente sobre la manifestación de las características físicas, químicas y organolépticas del cacao.

Profundizar los análisis físicos, químicos y organolépticos del cacao de las zonas cacaoteras aledañas, abarcando zonas del país consideradas de interés para el desarrollo productivo, económico y social.

Bibliografía

1. Moreno J.D. 2000. Calidad de cacao para usos industriales. Boletín del cacao 2:1-7.
2. Bogantes, E., R. 1989. Efectos de diferentes frecuencias de volteo durante la fermentación del cacao, sobre el pH y algunos parámetros de calidad. Tesis Ing Agr. Heredia, Universidad Nacional, Costa Rica. 47 p.
3. Diccionario de la Lengua española. 1984. Real Academia española. 20 a. Ed. Madrid, España. P 242.
4. Enríquez, G.A. 1985. Curso sobre el cultivo del cacao. Serie Materiales de enseñanza # 22. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 240 p.
5. López, a. 1987. Role of processing in cocoa. First Inter-American Cocoa Forum. Enero 1987., San José, Costa Rica. IICA, Coronado, Costa Rica. 5p.
6. Said, M. B.; Musa, M. J 1988. An integrated approach towards quality improvement of Malasyan cocoa beans. In conferencia Internacional de Investigación en Cacao (10ª. Santo Domingo, República Dominicana, 1987). Proceedings. Lagos Nigeria. 767 – 773 pp.
7. Wood, G. A. R.; Lass, R. A. 1985. Cocoa. Tropical Agriculture Series. London (G.B). Longman Group Limited. 620 p.
8. AMIN, I., JINAP, S. AND B. JAMILAH. 1998. Proteolytic activity (aspartic endoproteinase and carboxypeptidase) of cocoa bean during fermentation. J. Sci. Food Agric. 76:123-128.
9. ANZALDÚA A, La Evaluación Sensorial de los Alimentos, Editorial Acribia S.A., Zaragoza – España, 1994, Págs. 70 – 75.
10. BECKETT, S.T., Industrial chocolate manufacture and use. 2nd edition. Blackie/Chapman & Hall, 1994
11. BECKETT S. T., Fabricación y utilización industrial del chocolate, Editorial Acribia. 1994, Págs. 22 – 29.

12. BECKETT, S.T. Fabricación y utilización industrial del chocolate. Zaragoza, Acribia 1994 ICCO International Cocoa Organization.

13. BIEHL, B., MEYER, B., CRONE, G. Y L. POLLMANN. 1989. Chemical and physical changes in the pulp during ripening and post-harvest storage of Cocoa Pads. J. Sci. Food Agric. 48(2):189-208

14. Braudeau, J. (1970). El cacao. Traducido por Hernández C. Editorial Blume, Barcelona ES.

15. Gil, Á. (2010). Ttratado de Nutrición Tomo II. En Composición y calidad Nutritiva de los Alimentos. (pág. p. 343). Madrid-España: Editorial Medica Panamericana S.A.

16. Liendo, R. P. (1997). Characterization of cocoa butter extracted from Criollo cultivars of Theobroma cacao L.Food research international, 30(9), 727-731.

17. Moreno, L. S. (1989). Beneficio del cacao.Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA), Fascículo Nº 6, p. 14 16.

18. Schwan, R. W. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44, 205-221.

19. Wollgast, J. y. (2000). Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. 33 , 423-447. Food Research International,.

20. Carl E Hansen, M. d. (1998). Enzyme Activities in Cocoa Beans During Fermentation. J Sci Food Agric 77, 273-281.

21. Cros E, J. N. (1995). Cocoa quality: effect of fermentation and drying. Plantations, recherche, développement 24 , 25-27.

22. Ligia Ortiz de Bertorelli, H. M. (2006). Caracterización electroforética de las globulinas del grano fermentado de tres tipos de cacao. Obtenido de INCI [revista en la Internet]. 31(6): 441-445: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006000600011&lng=es

23. PUZIAH, H., S. JINAP, M. KHARIDAH and A. ASBI. 1999. Effect of drying time, bean depth and temperature on free amino acid, perptide-N sugar and pyrazine concentrations of Malaysian cocoa beans. J. Sci. Food Agric. 79:987-994

24. Cros, E. and N. Jeanjean. 1995. Cocoa quality: effect of fermentation and drying. Plantations, recherché, développement. 24:25-27

25. Braudeau, J. 1970. El Cacao. Primera edición. Editorial BLUME. Barcelona, España. 292 p.

26. Rohan, T. 1964. El beneficio del cacao bruto destinado al mercado. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 223 p.

4. Anexos

ANEXO A: Datos obtenidos respuestas experimentales.

Tabla A 1. Datos obtenidos de pH, °Brix, Acidez, Humedad, Humedad Relativa y peso de muestras recolectadas en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL del tratamiento a0b0.

			Ambiente		**Pulpa**	
Fecha	**Hora**	**Código**	**%HR**	**T (°C)**	**pH**	**°Brix**
12/08/2014	18:30	NH0	85	24	3,22	19,2
13/08/2014	7:00	NH1	91	23	3,27	14,8
	18:30	NH2	84	25	3,29	9,5
14/08/2014	7:00	NH3	91	23	3,33	4,2
	18:00	NH4	81	25	3,63	_
						_
						_
15/08/2014	6:00	NH5	93	23	3,8	_
						_
						_
	18:30	NH6	80	24	3,85	_
						_
						_

	Almendra				
	Acidez				
T Ferm (°C)	ml NaOH 0,01N	% Ac. Acético	pH	% H	w muestra (g)
27	3,6	0,009	6,61	37,510	173,96
	3,5	0,008	6,63	37,927	
	3,2	0,008	6,63		
25	4,62	0,011	6,5	35,794	124,01
	4	0,010	6,5	36,350	
	4,8	0,012	6,5		
27,8	5,9	0,014	6,49	33,547	133,9
	5,5	0,013	6,5	34,461	
	5,7	0,014	6,49		
27,6	6	0,014	6,38	34,060	121,03
	6,3	0,015	6,4	34,263	
	6,1	0,015	6,35		
32,5	6,4	0,015	6,35	34,641	117,63
	6,3	0,015	6,34	34,271	
	6	0,014	6,34		
34,8	13,3	0,032	5,68	37,575	116,96
	13,1	0,031	5,67	38,135	
	13,2	0,032	5,68		
43,4	48	0,115	4,8	38,104	140,89
	48,3	0,116	4,81	38,873	
	47,5	0,114	4,81		

Tabla A 2. Datos obtenidos de pH, °Brix, Acidez, Humedad, Humedad Relativa y peso de muestras recolectadas en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL del tratamiento a0b1.

			Ambiente		**Pulpa**	
Fecha	**Hora**	**Código**	**%HR**	**T (°C)**	**pH**	**°Brix**
12/08/2014	18:30	NR0	85	24	3,22	19,2
13/08/2014	7:00	NR1	91	23	3,27	14,4
	18:30	NR2	84	25	3,3	9,8
14/08/2014	7:00	NR3	91	23	3,33	9,3
	18:00	NR4	81	25	3,38	_
						_
						_
15/08/2014	6:00	NR5	93	23	3,42	_
						_
						_
	18:30	NR6	80	24	3,58	_
						_
						_

	Almendra				
	Acidez				
T Ferm (°C)	ml NaOH 0,01N	% Ac. Acético	pH	% H	w muestra (g)
26,9	3,3	0,008	6,49	36,439	
	3,2	0,008	6,49	35,462	170
	3	0,007	6,52		
24,4	5,2	0,012	6,59	35,63	
	5,5	0,013	6,57	36,124	146,28
	5,1	0,012	6,56		
27,7	5,9	0,014	6,5	35,506	
	6	0,014	6,49	35,572	129,79
	6,7	0,016	6,48		
28,4	6,4	0,015	6,47	34,489	
	6,3	0,015	6,46	34,38	128,43
	6,2	0,015	6,47		
31,1	5,5	0,013	5,49	34,931	
	5,3	0,013	5,5	35,412	121,99
	5,2	0,012	5,49		
33,8	6,5	0,016	5,14	37,788	
	6,6	0,016	5,11	37,885	94,06
	6	0,014	5,13		
44,6	62	0,149	4,65	38,208	
	58,5	0,140	4,65	37,544	129,56
	57	0,137	4,65		

Tabla A 3. Datos obtenidos de pH, °Brix, Acidez, Humedad, Humedad Relativa y peso de muestras recolectadas en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL del tratamiento a1b0.

			Ambiente		**Pulpa**	
Fecha	**Hora**	**Código**	**%HR**	**T (°C)**	**pH**	**°Brix**
11/08/2014	18:30	CH0	84	25	3,36	18
12/08/2014	7:00	CH1	91	22	3,27	17,6
	18:30	CH2	80	25	3,19	11,7
13/08/2014	7:00	CH3	91	23	3,25	
	18:00	CH4	85	24	3,55	_
						_
						_
14/08/2014	6:00	CH5	91	23	3,55	_
						_
						_
	18:30	CH6	81	26	3,66	_
						_
						_
15/08/2014	6:00	CH7	93	22	3,78	_
						_
						_
	18:30	CH8	80	24	4,22	_
						_
						_

	Almendra				
	Acidez				
T Ferm (°C)	**ml NaOH 0,01N**	**% Ac. Acético**	**pH**	**% H**	**w muestra (g)**
24,5	3,8	0,012	6,53	35,837	231,87
	4	0,012	6,6	36,014	
	4,2	0,011	6,58		
25,6	5,8	0,009	6,49	34,343	163,3
	6	0,010	6,53	34,645	
	5,3	0,010	6,58		
26,7	4,8	0,014	6,49	34,449	194,82
	4,8	0,014	6,48	34,513	
	4,6	0,013	6,43		
30,6	6,5	0,016	6,42	34,845	145,38
	6	0,014	6,42	35,093	
	6,1	0,015	6,43		
29,9	5,2	0,012	6,29	36,486	136,28
	5,3	0,013	6,28	36,129	
	5,2	0,012	6,26		
34	8,6	0,021	6,1	37,522	128,49
	8,5	0,020	6,12	36,636	
	8,6	0,021	6,12		
43,7	31,4	0,075	5,3	35,312	124,9
	30,4	0,073	5,38	35,42	
	30,1	0,072	5,29		
38,1	55,7	0,134	4,42	35,461	133,45
	57,2	0,137	4,41	35,492	
	58	0,139	4,41		
39,6	93	0,223	4,7	35,827	171,12
	92,5	0,222	4,69	36,246	
	93,5	0,224	4,68		

Tabla A 4. Datos obtenidos de pH, °Brix, Acidez, Humedad y Humedad Relativa y peso de muestras recolectadas en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL del tratamiento a1b1.

			Ambiente		**Pulpa**	
Fecha	**Hora**	**Código**	**%HR**	**T (°C)**	**pH**	**°Brix**
11/08/2014	18:30	CR0	80	26	3,41	17,8
12/08/2014	7:00	CR1	89	23	3,36	17,8
	18:30	CR2	79	26	3,31	16,1
13/08/2014	7:00	CR3	90	23	3,28	
	18:00	CR4	84	25	3,2	_
						_
						_
14/08/2014	6:00	CR5	91	23	3,12	_
						_
						_
	18:30	CR6	81	25	3,52	_
						_
						_
15/08/2014	6:00	CR7	93	23	3,75	_
						_
						_
	18:30	CR8	80	24	3,84	_
						_
						_

		Almendra			
		Acidez			
T Ferm (°C)	**ml NaOH 0,01N**	**% Ac. Acético**	**pH**	**% H**	**w muestra (g)**
25,6	4	0,010	6,55	33,871	165,22
	4	0,009	6,56	34,665	
	4,3	0,008	6,64		
25	4,5	0,010	6,55	33,781	149,7
	4,9	0,010	6,6	33,447	
	5,1	0,010	6,6		
27,5	4,2	0,011	6,54	33,654	152,42
	3,9	0,012	6,53	34,008	
	3,5	0,012	6,5		
32,4	6,8	0,016	6,39	33,737	151,42
	6,4	0,015	6,39	32,837	
	6,3	0,015	6,39		
36,1	6,6	0,016	6,1	33,816	132,24
	6,7	0,016	6,08	33,667	
	6,5	0,016	6,11		
41	46,5	0,112	5	34,786	183,24
	47,2	0,113	4,98	33,21	
	47,5	0,114	4,98		
44,5	91	0,218	4,57	36,033	139,18
	85	0,204	4,56	34,831	
	81,3	0,195	4,56		
44,8	87,5	0,210	4,38	37,979	124,62
	87	0,209	4,38	38,174	
	86,7	0,208	4,39		
39,7	70,2	0,168	4,88	36,506	182,83
	71,1	0,171	4,85	37,338	
	65	0,156	4,9		

Tabla A 5. Datos obtenidos de Determinación de grasa, valores de absorbancia de los análisis de índice de fermentación, flavonoides y polifenoles recolectadas en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL del tratamiento a0b0.

	Determinación grasa			**Ind. Ferm. Abs.**		**Flavonoides abs.**		**Polifenoles abs.**
Código	**w muestra**	**w_o balón**	**w_f balón**	**460nm**	**525nm**	**258nm**	**Patrón**	**760nm**
NH0	10,1441	126,7242	131,5743	0,057	0,079	3,514	3,634	0,066
NH1	11,3614	168,0534	173,4345	0,056	0,062	3,546	3,527	0,094
NH2	11,0861	205,1112	210,3714	0,084	0,085	3,533	3,500	0,127
NH3	11,1138	174,7912	180,0371	0,09	0,097	3,713	3,500	0,168
NH4	11,5765	126,9196	132,4209	0,109	0,11	3,836	3,500	0,184
NH5	11,1512	160,4016	165,6466	0,144	0,143	3,951	3,500	0,254
NH6	15,2831	126,7188	133,9286	0,157	0,154	4,179	3,526	0,293

Tabla A 6. Datos obtenidos de Determinación de grasa, valores de absorbancia de los análisis de índice de fermentación, flavonoides y polifenoles recolectadas en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL del tratamiento a0b1.

	Determinación grasa			**Ind. Ferm. Abs.**		**Flavonoides abs.**		**Polifenoles abs.**
Código	**w muestra**	**w_o balón**	**w_f balón**	**460nm**	**525nm**	**258nm**	**Patrón**	**760nm**
NR0	10,1441	126,7242	131,5743	0,057	0,079	3,514	3,634	0,080
NR1	10,3951	126,9243	131,9112	0,07	0,089	3,537	3,634	0,098
NR2	10,3697	168,0609	172,9375	0,054	0,065	3,502	3,589	0,113
NR3	10,9048	205,1384	210,2948	0,072	0,079	3,556	3,634	0,145
NR4	10,9094	174,7978	180,0174	0,048	0,052	3,5	3,518	0,164
NR5	10,3945	160,4287	165,4163	0,073	0,072	3,527	3,518	0,204
NR6	11,6956	126,7188	132,2958	0,105	0,101	3,583	3,518	0,26

Tabla A 7. Datos obtenidos de Determinación de grasa, valores de absorbancia de los análisis de índice de fermentación, flavonoides y polifenoles recolectadas en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL del tratamiento a1b0.

	Determinación grasa			Ind. Ferm. Abs.		Flavonoides abs.		Polifenoles abs.
Código	**w muestra**	**w_o balón**	**w_f balón**	**460nm**	**525nm**	**258nm**	**Patrón**	**760nm**
CH0	16,4596	168,0557	176,2393	0,044	0,053	3,465	3,526	0,065
CH1	17,4155	205,113	213,7449	0,06	0,071	3,546	3,526	0,072
CH2	16,5622	174,7922	182,9647	0,081	0,091	3,549	3,529	0,165
CH3	19,0025	126,9208	136,2697	0,085	0,092	3,559	3,529	0,162
CH4	16,2145	160,401	168,4077	0,087	0,094	3,857	3,829	0,167
CH5	17,9217	126,718	135,6069	0,093	0,092	3,862	3,829	0,18
CH6	18,3503	168,0494	177,2118	0,092	0,081	3,888	3,829	0,203
CH7	15,8791	205,1103	212,9212	0,121	0,091	3,665	3,829	0,198
CH8	18,9831	174,7892	183,9586	0,108	0,091	3,577	3,844	0,177

Tabla A 8. Datos obtenidos de determinación de grasa, valores de absorbancia de los análisis de índice de fermentación, flavonoides y polifenoles recolectadas en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL del tratamiento a1b1.

	Determinación grasa			Ind. Ferm. Abs.		Flavonoides abs.		Polifenoles abs.
Código	**w muestra**	**w_o balón**	**w_f balón**	**460nm**	**525nm**	**258nm**	**Patrón**	**760nm**
CR0	16,4596	168,0557	176,2393	0,044	0,053	3,465	3,526	0,065
CR1	16,8639	126,9188	135,3348	0,051	0,06	3,521	3,844	0,072
CR2	17,997	160,3982	169,2806	0,061	0,065	3,528	3,844	0,09
CR3	18,2319	126,7462	135,7066	0,057	0,058	3,521	3,844	0,093
CR4	18,1463	168,0904	176,9891	0,062	0,063	3,178	3,084	0,123
CR5	19,5341	205,1564	214,788	0,069	0,069	3,325	3,084	0,188
CR6	21,6148	174,8269	185,4832	0,119	0,11	3,274	3,084	0,234
CR7	21,4117	126,9438	137,4519	0,138	0,126	3,124	3,084	0,244
CR8	18,9654	160,4359	169,2279	0,164	0,136	3,075	3,084	0,139

Tabla A 9. Promedios obtenidos de pH, Acidez, % Humedad, % Grasa, índice de fermentación, flavonoides y polifenoles de muestras recolectadas en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL del tratamiento a0b0.

		Pulpa	**Almendras**		
Código	**Tiempo (horas)**	**pH**	**% Ac. acético**	**pH**	**%H**
NH0	0	3,22	0,008	6,62	37,72
NH1	10,5	3,27	0,011	6,50	36,07
NH2	20	3,29	0,014	6,49	34,00
NH3	30,5	3,33	0,015	6,38	34,16
NH4	39,5	3,63	0,015	6,34	34,46
NH5	49,5	3,80	0,032	5,68	37,86
NH6	60	3,85	0,115	4,81	38,49

% Grasa	Ind. Ferm.	Grado ferm.	Flavonoides % Quercetina	Polifenoles (mg/g Ac Gálico)
47,81	0,72	f. insuf	19,34	13,81
47,36	0,90	f. insuf	20,11	18,72
47,45	0,93	f. insuf	20,19	24,51
47,20	0,99	f. insuf	21,22	31,70
47,52	0,99	f. insuf	21,92	34,51
47,04	1,01	f. correct	22,58	46,79
47,17	1,02	f. correct	23,70	53,63

Tabla A 10. Promedios obtenidos de pH, Acidez, % Humedad, % Grasa, índice de fermentación, flavonoides y polifenoles de muestras recolectadas en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL del tratamiento a0b1.

		Pulpa	Almendras		
Código	**Tiempo (horas)**	**pH**	**% Ac. acético**	**pH**	**%H**
NR0	0	3,22	0,008	6,50	35,95
NR1	10,5	3,27	0,013	6,57	35,88
NR2	20	3,3	0,016	6,48	35,54
NR3	30,5	3,33	0,015	6,47	34,43
NR4	39,5	3,38	0,013	5,49	35,17
NR5	49,5	3,42	0,015	5,13	37,84
NR6	60	3,58	0,142	4,65	37,88

Tabla A 11. Promedios obtenidos de pH, Acidez, % Humedad, % Grasa, índice de fermentación, flavonoides y polifenoles de muestras recolectadas en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL del tratamiento a1b0.

		Pulpa	Almendras		
Código	**Tiempo (horas)**	**pH**	**% Ac. acético**	**pH**	**%H**
CH0	0	3,36	0,011	6,57	35,93
CH1	10,5	3,27	0,01	6,53	34,49
CH2	20	3,19	0,014	6,43	34,48
CH3	30,5	3,25	0,015	6,42	34,97
CH4	39,5	3,55	0,013	6,28	36,31
CH5	49,5	3,55	0,021	6,11	37,08
CH6	60	3,66	0,074	5,32	35,37
CH7	70	3,78	0,137	4,41	35,48
CH8	80,5	4,22	0,223	4,69	36,04

% de Grasa	Ind. Ferm.	Grado ferm.	Flavonoides % Quercetina	Polifenoles (mg/g Ac Gálico)
47,81	0,72	f. insuf	19,34	16,26
47,97	0,79	f. insuf	19,47	19,42
47,03	0,83	f. insuf	19,52	22,05
47,29	0,91	f. insuf	19,57	27,67
47,84	0,92	f. insuf	19,90	31,00
47,98	1,01	f. correct	20,05	38,02
47,68	1,04	f. correct	20,37	47,84

% Grasa	Ind. Ferm.	Grado ferm.	Flavonoides % Quercetina	Polifenoles (mg/g Ac Gálico)
49,72	0,83	f. insuf	19,65	13,632
49,56	0,85	f. insuf	20,11	14,86
49,34	0,89	f. insuf	20,11	31,175
49,2	0,92	f. insuf	20,17	30,649
49,38	0,93	f. insuf	20,15	31,526
49,6	1,01	f. correct	20,17	33,807
49,93	1,14	f. correct	20,31	37,842
49,19	1,33	sobreferm.	19,14	36,965
48,3	1,19	sobreferm.	18,61	33,281

Tabla A 12. Promedios obtenidos de pH, Acidez, % Humedad, % Grasa, índice de fermentación, flavonoides y polifenoles de muestras recolectadas en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL del tratamiento a1b1.

		Pulpa	**Almendras**		
Código	**Tiempo (horas)**	**pH**	**% Ac. acético**	**pH**	**%H**
CR0	0	3,41	0,009	6,58	34,27
CR1	10,5	3,36	0,010	6,58	33,61
CR2	20	3,31	0,012	6,50	33,83
CR3	30,5	3,28	0,016	6,39	33,29
CR4	39,5	3,20	0,016	6,10	33,74
CR5	49,5	3,12	0,113	4,99	34,00
CR6	60	3,52	0,206	4,56	35,43
CR7	69,5	3,75	0,209	4,38	38,08
CR8	80,5	3,84	0,165	4,88	36,92

Tabla A 13. Datos promedio obtenidos de exudado al inicio de la fermentación.

	Acidez	
Variedad	**ml NaOH 0,01N**	**% Ac. acético**
Nacional	3,2 ± 0,00	0,008 ± 0,02
CCN51	3,1 ± 0,00	0,007 ± 0,05

% Grasa	Ind. Ferm.	Grado ferm.	Flavonoides % Quercetina	Polifenoles (mg/g Ac Gálico)
49,72	0,83	f. insuf	19,65	13,63
49,91	0,85	f. insuf	18,32	14,86
49,35	0,94	f. insuf	18,36	18,02
49,15	0,98	f. insuf	18,32	18,54
49,04	0,98	f. insuf	20,61	23,81
49,31	1,00	f. correct	21,56	35,21
49,30	1,08	f. correct	21,23	43,28
49,08	1,10	f. correct	20,26	45,04
46,36	1,21	sobreferm.	19,94	26,61

Flavonoides abs.		
258nm	Patrón	Flavonoides % Quercetina
0,299	0,347	17,234 ± 0,12
0,264	0,374	14,118 ± 0,10

Tabla A 14. Análisis de taninos

MC-LSAIA-2201-03

INSTITUTO NACIONAL AUTONOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
ESTACION EXPERIMENTAL SANTA CATALINA
DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y CALIDAD
LABORATORIO DE SERVICIO DE ANALISIS E INVESTIGACION EN ALIMENTOS
Panamericana Sur Km. 1, CutuglaguaTfls. 2690691-3007134, Fax 3007134
Casilla postal 17-01-340

INIAP

LSAIA/DNCIEESC

INFORME DE ENSAYO No: 15-0219

NOMBRE PETICIONARIO	Ing. William Teneda	INSTITUCION:	Particular
DIRECCION:	Urbanización Aeropuerto - Ambato	ATENCION:	Ing. William Teneda
FECHA DE EMISION:	05/08/2015	FECHA DE RECEPCION.:	28/07/2015
FECHA DE ANALISIS:	Del 29 de Julio al 3 de agosto de 2015	HORA DE RECEPCION:	12H45
		ANALISIS SOLICITADO	POLIFENOLES, TANINOS, NO TANINOS

ANALISIS		POLIFENOLES	TANINOS	NO TANINOS			IDENTIFICACIÓN
MÉTODO		MO-LSAIA-31	MO-LSAIA-31	MO-LSAIA-31			
METODO REF.		Cross. E. y Marynga G. 1973/1982	Cross. E. y Marynga G. 1973/1982	Cross. E. y Marynga G. 1973/1982			
UNIDAD		mg/Ac.Gálico/g	mg/Ac.Gálico/g	mg/Ac.Gálico/g			
15-1260		101.81	36.61	65.21			Cacao fermentado liofilizado 1
15-1261		112.88	33.51	79.38			Cacao fermentado liofilizado 9

Los ensayos marcados con Ω se reportan en base seca.
OBSERVACIONES: Muestra entregada por el cliente

RESPONSABLES DEL INFORME

Dr. Armando Rubio
RESPONSABLE DE CALIDAD

LABORATORIO LSAIA
I.N.I.A.P.
EST. EXP. SANTA CATALINA

Dr. Iván Samaniego
RESPONSABLE TECNICO

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio

Los resultados arriba indicados solo están relacionados con el objeto de ensayo

NOTA DE DESCARGO: La información contenida en este informe de ensayo es de carácter confidencial, está dirigido únicamente al destinatario de la misma y solo podrá ser usada por este. Si el lector de este correo electronico o fax no es el destinatario del mismo, se le notifica que cualquier copia o distribución de este se encuentra totalmente prohibido. Si usted ha recibido este informe de ensayo por error, por favor notifique inmediatamente al remitente por este mismo medio y elimine la información.

ANEXO B: Análisis Estadístico

Porcentaje de grasa

Tabla B 1. Análisis de variancia para porcentaje de grasa en relación a la variedad, tipo de fermentador y tiempo de fermentación.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:VARIEDAD	8,0802	1	8,0802	184,13	0,0009
B:TIPO FERMENTADOR	0,01125	1	0,01125	0,26	0,6475
C:REPLICA	0,00045	1	0,00045	0,01	0,9257
INTERACCIONES					
AB	0,845	1	0,845	19,26	0,0219
RESIDUOS	0,13165	3	0,0438833		
TOTAL (CORREGIDO)	9,06855	7			

Tabla B 2. Prueba de comparación de Tukey para % de Grasa por variedad de cacao.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

VARIEDAD	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
NACIONAL	4	47,4675	0,104742	B
CCN51	4	49,4775	0,104742	A

Tabla B 3. Prueba de comparación de Tukey para % de Grasa por tipo fermentador.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

TIPO FERMENTADOR	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Horizontal	4	48,435	0,104742	A
Rotatorio	4	48,51	0,104742	A

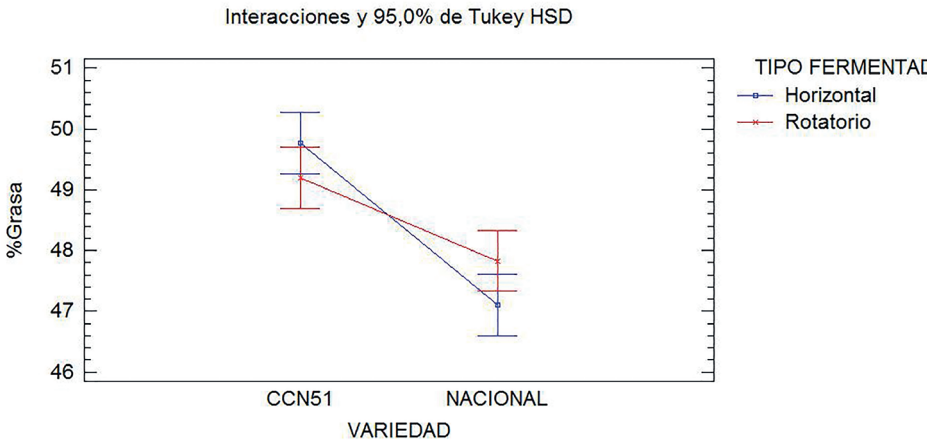


Figura B 1. Interacción entre variedad de cacao y tipo de fermentador.

Índice de fermentación

Tabla B 4. Análisis de variancia para índice de fermentación en relación a la variedad, tipo de fermentador y tiempo de fermentación.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:VARIEDAD	0,0032	1	0,0032	96,00	0,0023
B:TIPO FERMENTADOR	0,0032	1	0,0032	96,00	0,0023
C:REPLICA	0,0002	1	0,0002	6,00	0,0917
INTERACCIONES					
AB	0,00245	1	0,00245	73,50	0,0033
RESIDUOS	0,0001	3	0,0000333333		
TOTAL (CORREGIDO)	0,00915	7			

Tabla B 5. Prueba de comparación de Tukey para índice de fermentación por variedad de cacao.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

VARIEDAD	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
NACIONAL	4	1,0125	0,00288675	B
CCN51	4	1,0525	0,00288675	A

Tabla B 6. Prueba de comparación de Tukey para índice de fermentación por tipo fermentador.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

TIPO FERMENTADOR	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	4	1,0125	0,00288675	B
2	4	1,0525	0,00288675	A

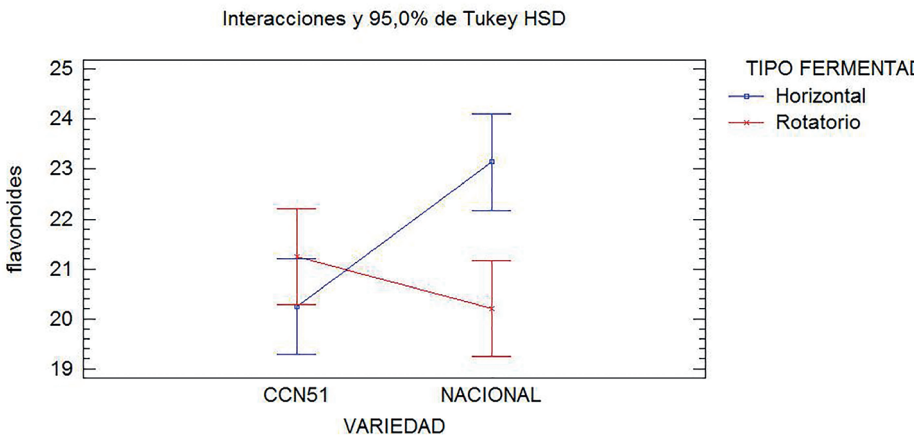


Figura B 2. Interacción entre variedad de cacao y tipo de fermentador.

Flavonoides

Tabla B 7. Análisis de variancia para porcentaje de flavonoides en relación a la variedad, tipo de fermentador y tiempo de fermentación.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:VARIEDAD	1,73911	1	1,73911	10,88	0,0458
B:TIPO FERMENTADOR	1,85281	1	1,85281	11,60	0,0423
C:REPLICA	1,01531	1	1,01531	6,35	0,0861
INTERACCIONES					
AB	7,74211	1	7,74211	48,46	0,0061
RESIDUOS	0,479338	3	0,159779		
TOTAL (CORREGIDO)	12,8287	7			

Tabla B 8. Prueba de comparación de Tukey para porcentaje de flavonoides por variedad de cacao.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

VARIEDAD	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
CCN51	4	20,7425	0,199862	B
NACIONAL	4	21,675	0,199862	A

Tabla B 9. Prueba de comparación de Tukey para porcentaje de flavonoides por tipo fermentador.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

TIPO FERMENTADOR	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Rotatorio	4	20,7275	0,199862	B
Horizontal	4	21,69	0,199862	A

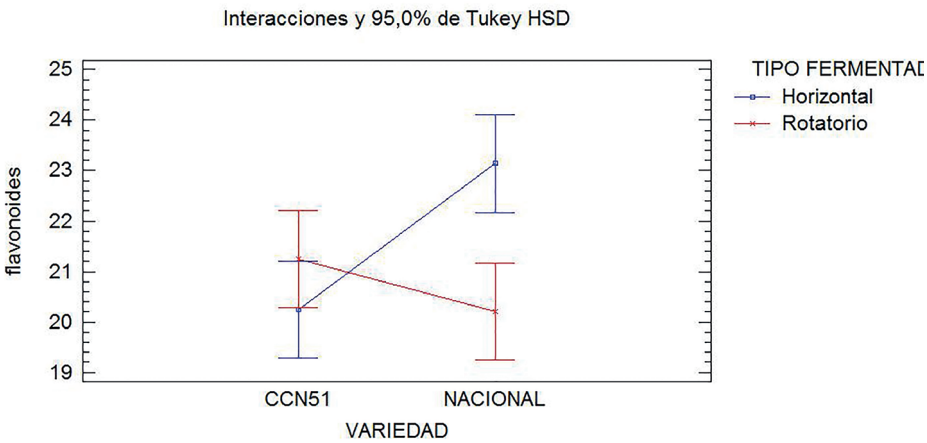


Figura B 3. Interacción entre variedad de cacao y tipo de fermentador.

Polifenoles

Tabla B 10. Análisis de variancia para polifenoles en relación a la variedad, tipo de fermentador y tiempo de fermentación.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:VARIEDAD	237,511	1	237,511	10,50	0,0478
B:TIPO FERMENTADOR	26,1726	1	26,1726	1,16	0,3609
C:REPLICA	28,7661	1	28,7661	1,27	0,3415
INTERACCIONES					
AB	178,7	1	178,7	7,90	0,0673
RESIDUOS	67,8648	3	22,6216		
TOTAL (CORREGIDO)	539,014	7			

Tabla B 11. Prueba de comparación de Tukey para polifenoles por variedad de cacao.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

VARIEDAD	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
CCN51	4	42,36	2,37811	B
NACIONAL	4	53,2575	2,37811	A

Tabla B 12. Prueba de comparación de Tukey para polifenoles por tipo fermentador.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

TIPO FERMENTADOR	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Horizontal	4	46,0	2,37811	A
Rotatorio	4	49,6175	2,37811	A

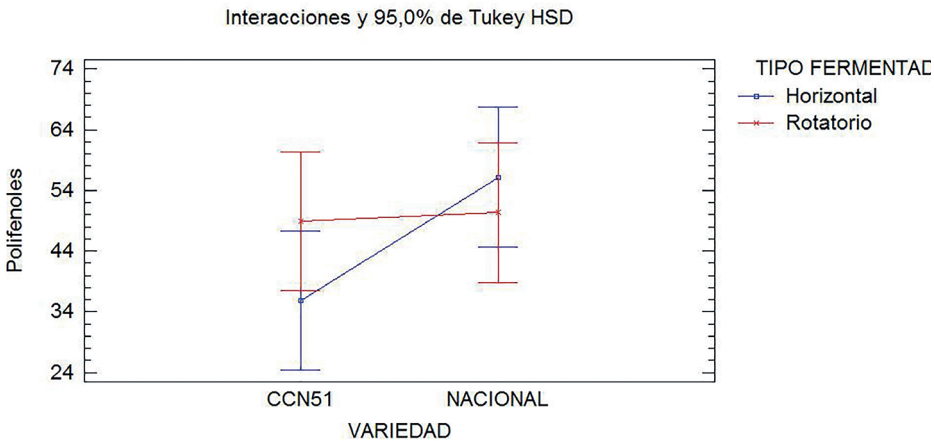


Figura B 4. Interacción entre variedad de cacao y tipo de fermentador.

ANEXO C: Gráficos

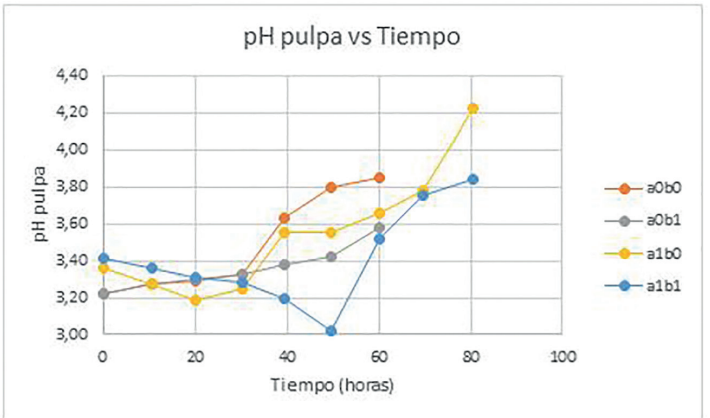


Figura C 1. Promedio pH pulpa vs Tiempo (horas) durante el proceso de fermentación de cacao.

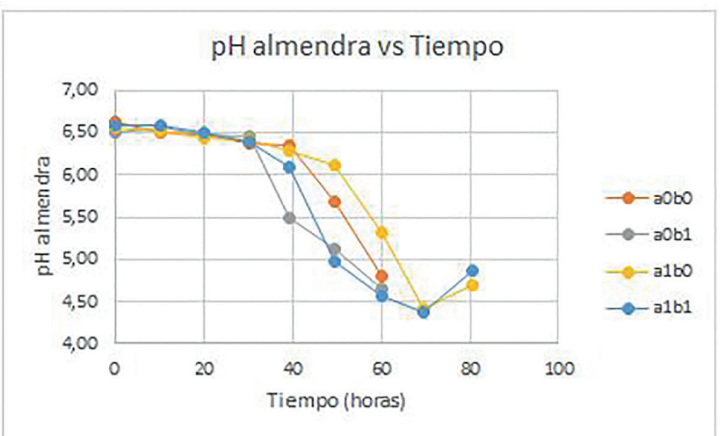


Figura C 2. Promedio pH almendra vs Tiempo (horas) durante el proceso de fermentación de cacao.

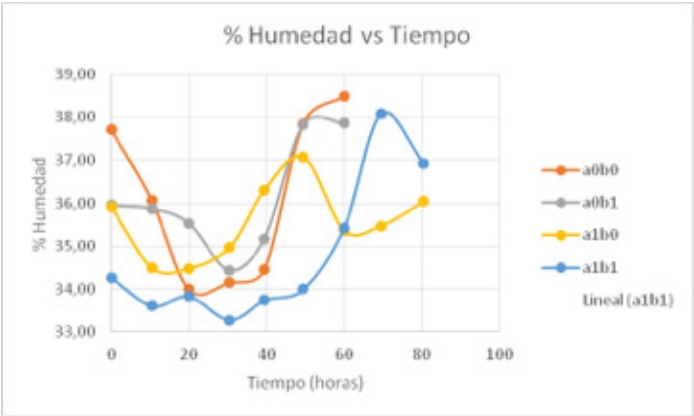


Figura C 3. Promedio porcentaje de humedad vs Tiempo (horas) durante el proceso de fermentación de cacao.

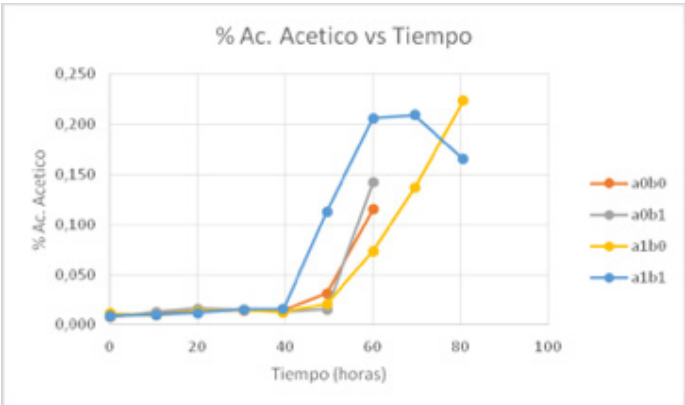


Figura C 4. Promedio porcentaje de Ac. Acético vs Tiempo (horas) durante el proceso de fermentación de cacao.

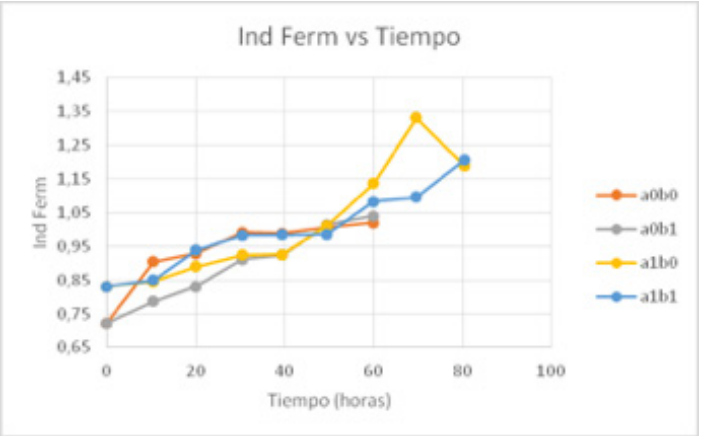


Figura C 5. Promedio de índice de fermentación vs Tiempo (horas) durante el proceso de fermentación de cacao

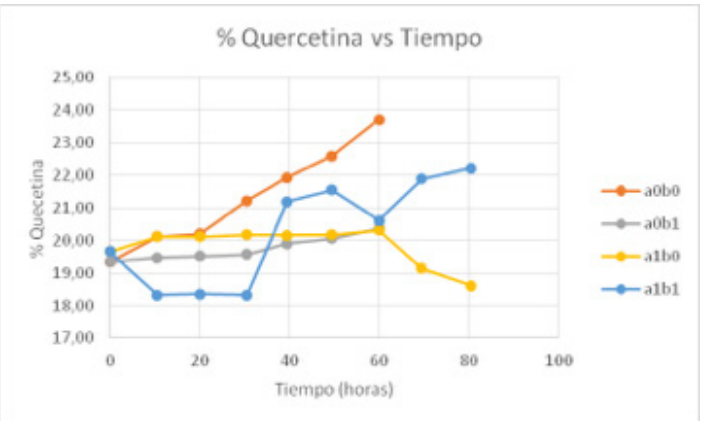


Figura C 6. Promedio porcentaje de quercetina vs Tiempo (horas) durante el proceso de fermentación de cacao.

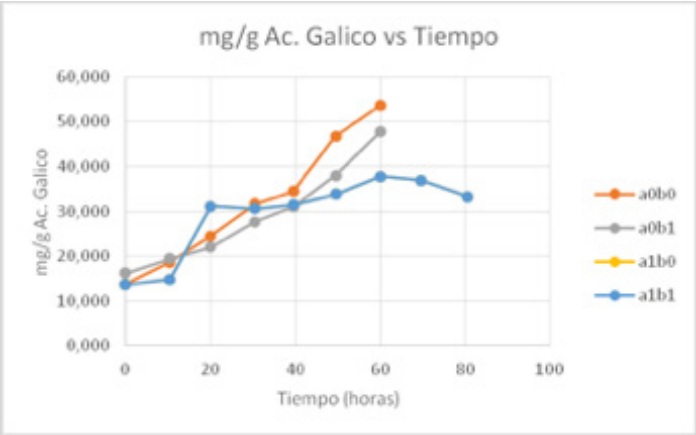


Figura C 7. Promedio mg/g Ac. Gálico vs Tiempo (horas) durante el proceso de fermentación de cacao.

ANEXO D: Análisis Enzimáticos

Tabla D 1. Pesos obtenidos de polvo liofilizado desengrasado con cetona de cada tratamiento.

Tratamiento	Peso inicial DW	Peso final DW
a0b1 inicio	1,0005	0,6430
a0b0 inicio	1,0007	0,6557
a1b1 inicio	1,0000	0,6139
a1b0 inicio	1,0003	0,6321
a0b1 final	1,0001	0,6163
a0b0 final	1,0002	0,6225
a1b1 final	1,0010	0,6592
a1b0 final	1,0000	0,6119

Tabla D 2. Datos obtenidos de pesos y absorbancias para la elaboración de curva de calibración a partir de tirosina como estándar.

CURVA DE CALIBRACION TIROSINA					
TIROSINA					
(µl)	PESO (g)	HCl 0.2N (µl)	Peso total	ABS. 600nm	[TYR] µmol/ml
0,00	0	1,50	1,3280	0	0
0,30	0,4319	1,20	1,4399	0,628	47,9922
0,60	0,6698	0,90	1,4463	0,976	74,0980
0,90	0,9289	0,60	1,4472	1,405	102,6976
1,20	1,1929	0,30	1,4487	1,775	131,7485
1,50	1,4275	0,00	1,4275	2,105	160,0000

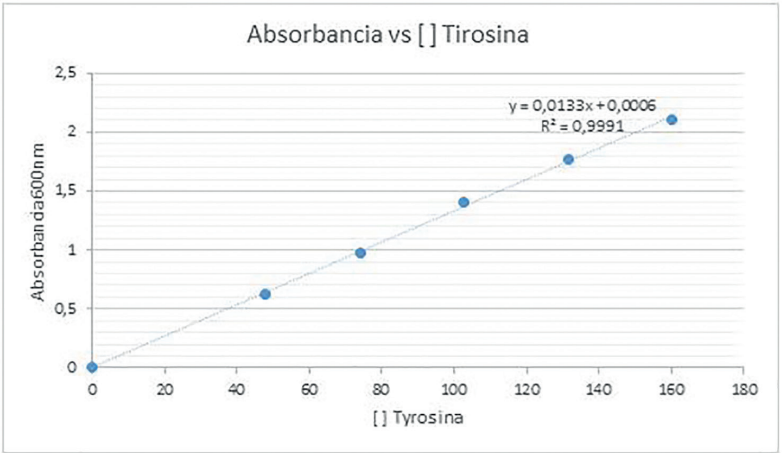


Figura E 1. Gráfica absorbancia vs concentración de tirosina

Tabla D 3. Datos obtenidos de los distintos tratamientos recolectados en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL para el cálculo de endoproteasa.

	Peso (mg)		**ABS 600nm**		**[Tyr] µmol/ml**	
Tratamientos	**R1**	**R2**	**R1**	**R2**	**R1**	**R2**
a0b1 inicio	20,2	20,1	2,346	2,366	175,8725	177,3716
a0b0 inicio	20,0	20,0	2,371	2,359	177,7463	176,8469
a1b1 inicio	20,2	20,2	2,217	2,235	166,2033	167,5525
a1b0 inicio	20,2	20,2	2,234	2,244	167,4776	168,2271
a0b1 final	20,2	20,1	1,993	2,082	149,4135	156,0845
a0b0 final	20,0	20,0	1,942	1,958	145,5908	146,7901
a1b1 final	20,2	20,2	2,126	2,155	159,3825	161,5562
a1b0 final	20,2	20,2	1,905	1,906	142,8175	142,8925

Tabla D 4. Valores obtenidos de actividad enzimática endoproteasa en la réplica 1 y 2 en cada tratamiento.

	R1			**R2**		
Tratamiento	**Pendiente**	**UI (mg-1)**	**UI (g-1) de polvo liofilizado DW**	**Pendiente**	**UI (mg-1)**	**UI (g-1) de polvo liofilizado DW**
a0b1 inicio	5,8624	0,2902	451,5766	5,9124	0,2941	457,6915
a0b1 final	4,9805	0,2466	400,1000	5,2028	0,2588	420,0429
a0b0 inicio	5,9249	0,2962	452,1142	5,8949	0,2947	449,8264
a0b0 final	4,8530	0,2427	389,8794	4,8930	0,2447	393,0909
a1b1 inicio	5,5401	0,2743	446,7551	5,5851	0,2765	450,3817
a1b1 final	5,3127	0,2630	399,3786	5,3852	0,2666	404,8254
a1b0 inicio	5,5826	0,2764	437,3494	5,6076	0,2776	439,3067
a1b0 final	4,7606	0,2357	385,1487	4,7631	0,2358	385,3508

Tabla D 5. Valores promedio de actividad enzimática proteasa y desviación estándar para cada tratamiento.

	UI g-1 de polvo liofilizado DW
Tratamiento	**Promedio**
a0b1 inicio	454,6340 ± 4,32
a0b1 final	410,0714 ± 14,10
a0b0 inicio	450,9703 ± 1,62
a0b0 final	391,4852 ± 2,27
a1b1 inicio	448,5684 ± 2,56
a1b1 final	402,1020 ± 3,85
a1b0 inicio	438,3281 ± 1,38
a1b0 final	385,2497 ± 0,14

Tabla D 6. Datos obtenidos de pesos, absorbancias y concentraciones para la elaboración de curva de calibración a partir de glucosa como estándar.

SOLUCION GLUCOSA		H2O (µl)	PESO TOTAL (g)	CROMOGENO (ml)	ABS 600nm	[Glc] mg/ml
(µl)	PESO (g)					
0	0	120	0,1187	1,2	0	0
20	0,0191	100	0,1178	1,2	0,205	0,0655
40	0,0390	80	0,1180	1,2	0,428	0,1335
60	0,0588	60	0,1177	1,2	0,648	0,2018
80	0,0790	40	0,1190	1,2	0,866	0,2682
100	0,0976	20	0,1180	1,2	1,061	0,3341
120	0,1191	0	0,1191	1,2	1,250	0,4040

Elaborado por: Dario I. Ojeda S., 2015

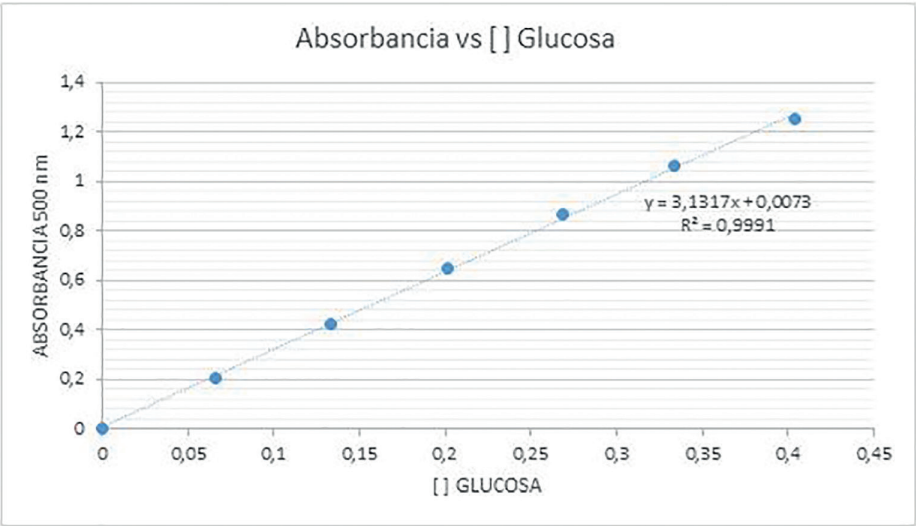


Figura E 2. Gráfica absorbancia vs concentración de glucosa

Tabla D 7. Datos obtenidos de los distintos tratamientos recolectados en ASOCIACIÓN AGRO INDUSTRIAL para el cálculo de invertasa.

	Peso (mg)		**ABS 505 nm**		**[Glc] mg/ml**	
Tratamientos	**R1**	**R2**	**R1**	**R2**	**R1**	**R2**
a0b1 inicio	80,0	80,2	0,150	0,159	0,0457	0,0486
a0b0 inicio	80,1	80,0	0,157	0,152	0,0479	0,0463
a1b1 inicio	80,1	80,1	0,144	0,135	0,0438	0,0409
a1b0 inicio	80,2	80,1	0,118	0,132	0,0355	0,0399
a0b1 final	80,1	80,2	0,009	0,012	0,0007	0,0017
a0b0 final	80,2	80,0	0,008	0,015	0,0004	0,0026
a1b1 final	80,2	80,2	0,011	0,008	0,0013	0,0004
a1b0 final	80,0	80,1	0,013	0,007	0,0020	0,0001

Tabla D 8. Valores obtenidos de actividad enzimática de invertasa en la réplica 1 y 2 en cada tratamiento.

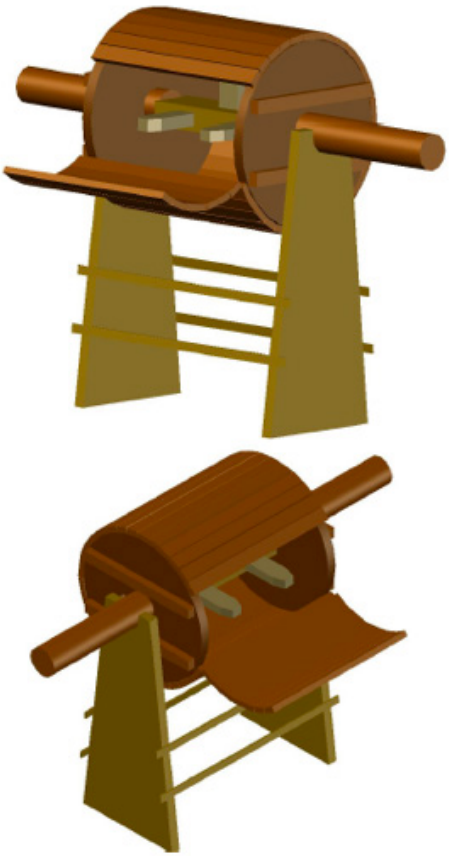
	R1		
Tratamiento	**Pendiente**	**UI (mg-1)**	**UI (g-1) en polvo liofilizado DW**
a0b1 inicio	0,0003	1,7612E-05	0,0274
a0b1 final	3,9246E-06	2,7197E-07	0,0004
a0b0 inicio	0,0003	1,8450E-05	0,0282
a0b0 final	2,1522E-06	1,4895E-07	0,0002
a1b1 inicio	0,0002	1,6853E-05	0,0275
a1b1 final	7,4694E-06	5,1697E-07	0,0008
a1b0 inicio	0,0002	1,3643E-05	0,0216
a1b0 final	1,1014E-05	7,6422E-07	0,0012

Tabla D 9. Valores promedio de actividad enzimática invertasa y desviación estándar para cada tratamiento.

	UI (g-1) en polvo liofilizado WD
Tratamientos	**Promedio**
a0b1 inicio	0,0282 ± 0,0012
a0b1 final	0,0007 ± 0,0004
a0b0 inicio	0,0277 ± 0,0006
a0b0 final	0,0009 ± 0,0010
a1b1 inicio	0,0266 ± 0,0013
a1b1 final	0,0005 ± 0,0004
a1b0 inicio	0,0230 ± 0,0019
a1b0 final	0,0006 ± 0,0009

R2		
Pendiente	**UI (mg-1)**	**UI (g-1) en polvo liofilizado DW**
0,0003	1,8672E-05	0,0291
9,2419E-06	6,3964E-07	0,0010
0,0003	1,7858E-05	0,0273
1,4559E-05	1,0102E-06	0,0016
0,0002	1,5748E-05	0,0257
2,1522E-06	1,4895E-07	0,0002
0,0002	1,5379E-05	0,0243
3,7975E-07	2,6316E-08	0,0000

ANEXO E: Fermentador rotatorio-mejoramiento tecnológico



En esta investigación se describe el proceso de fermentación del cacao (Theobroma cacao l) de las variedades nacional y CCN51 utilizando dos tipos de fermentadores el tipo convencional tipo horizontal y el rotatorio [mejoramiento tecnológico], para obtener mayores niveles de calidad, mediante la cuantificación del índice de fermentación, contenido de polifenoles, flavonoides y taninos en almendras de cacao y la cuantificación del contenido de invertasa y proteasas en las almendras.

Los factores en estudio influyeron positivamente sobre la calidad del cacao, los cambios físicos y químicos se inician desde el comienzo de la fermentación con tendencias definidas para cada una de las variables analizadas, se comparó los valores de pH, acidez, % humedad y grasa.

Otras publicaciones de los Premios de Estudios Iberoamericanos Grupo La Rábida. Área Científico-Ténica

Vélez B. Iván Darío (coord.):
Desarrollo de un sistema de alerta temprana para la malaria en Colombia.

De Arazoza, Héctor (coord.):
Modelado y análisis de la epidemia de VIH-SIDA en Cuba.

Polliotto, Gabriela:
En busca de un río perdido. Diagnóstico del impacto ambiental en la ribera del río Arenales, en relación a la expansión de asentamientos no planificados.

Rodríguez Miranda, Willy R. (coord.):
Por una coexistencia responsable con los peligros naturales.

Pérez López, Rafael; Castillo Hernández, Julio César; Nieto Liñán, José Miguel; Gómez Arias, Alba:
Atenuación natural de la contaminación de las balsas de fosfoyeso mediante bacterias sulfato UVP reductoras.

Tejeda Benítez, Lesly Patricia; Olivero Verbel, Jesús Tadeo:
Perfil toxicológico de los sedimentos del río Magdalena usando como modelo biológico 'Caenorhabditis elegans'.

unia Universidad Internacional de Andalucía
Premio de Estudios Iberoamericanos Grupo La Rábida 10
Área Científico-Técnica